

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-285386

(43)Date of publication of application : 19.10.1999

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
C12Q 1/68  
G01N 21/78  
G01N 33/58  
// G01N 21/64

(21)Application number : 10-091580

(71)Applicant : BUNSHI BIO PHOTONICS  
KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 03.04.1998

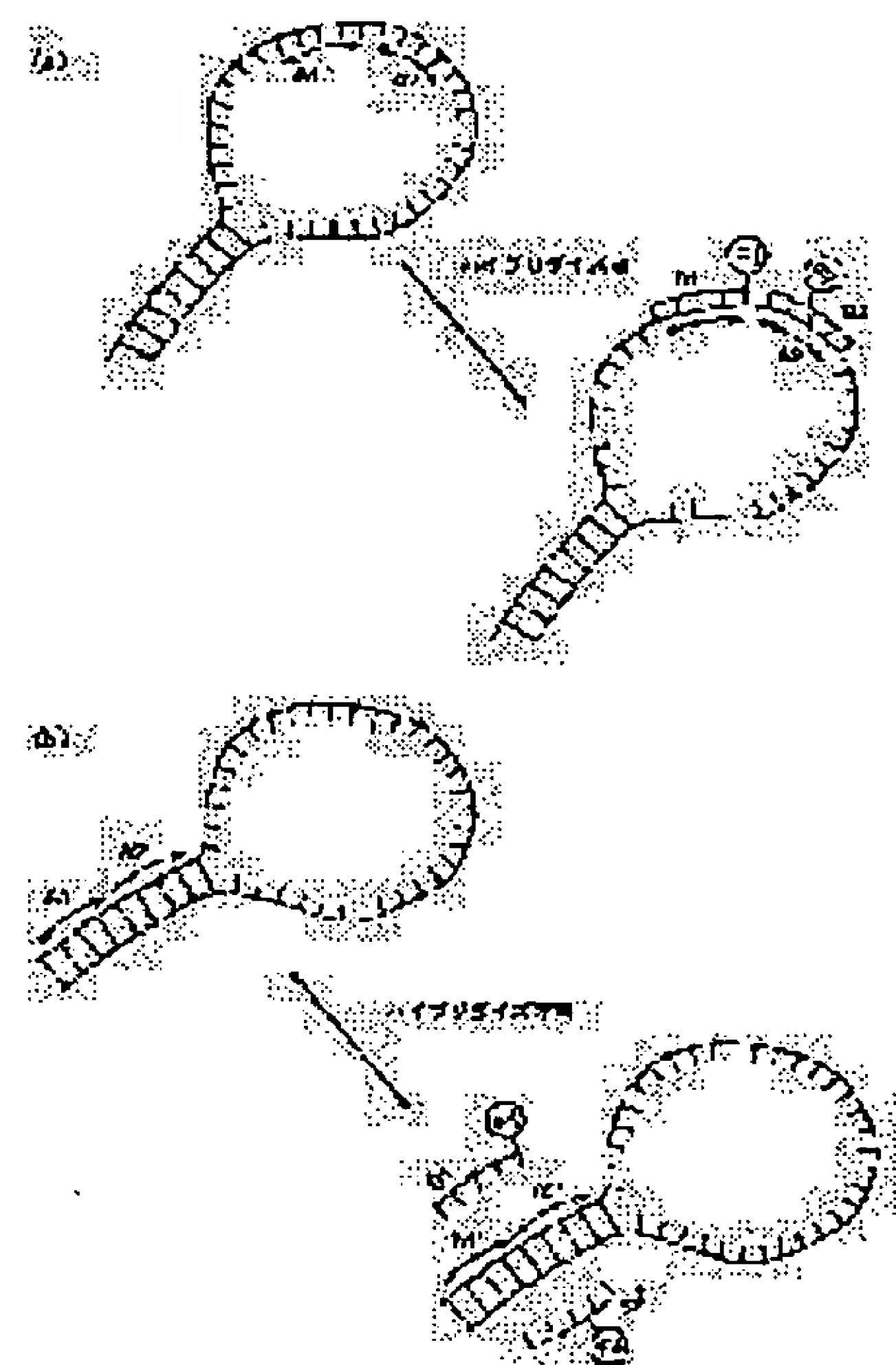
(72)Inventor : KOSHIMOTO HIROYUKI  
KONDO SATOSHI  
ISHIBASHI KANAME  
TSUJI AKIHIKO

## (54) METHOD FOR DETECTING HIGHER-ORDER STRUCTURE OF RNA

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To detect a higher-order structure of an RNA from a result obtained by detecting a sequence B1B2 in which a probe P1 of a sequence B1 complementary with A1 in a specific sequence A1A2 of the RNA and a probe P2 of a sequence complementary with A2 are successively hybridized.

SOLUTION: A higher-order structure of an RNA is detected by detecting a successive base sequence B1B2 formed on the said RNA by successively hybridizing P1 with P2 by reacting a probe P1 having a base sequence B1 capable of hybridizing with A1 out of a specific succeeding base sequence A1A2 in the RNA with a probe P2 having a base sequence B2 capable of hybridizing with A2 out of the specific succeeding base sequence in the RNA, and judging that the higher-order structure of the specific succeeding base sequence A1A2 is a single-stranded when the said successive base sequence B1B2 is detected and the higher-order structure of the specific succeeding base sequence A1A2 is a double-stranded when the said successive base sequence B1B2 is not detected.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.12.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

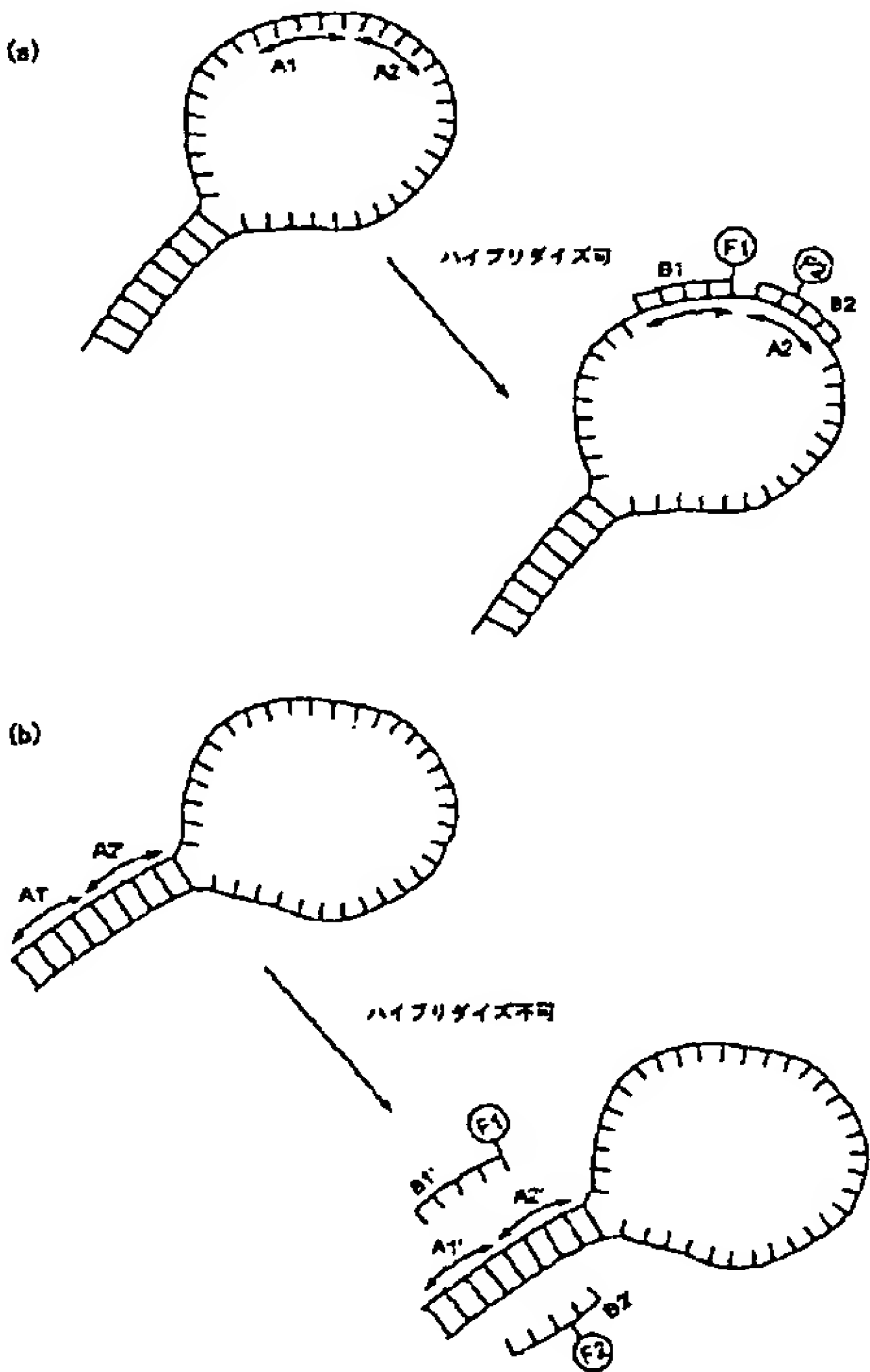
(51)Int.Cl. <sup>6</sup>		識別記号	F I	
C 1 2 N	15/09	Z N A	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/68		C 1 2 Q	1/68 A
G 0 1 N	21/78		G 0 1 N	21/78 C
	33/58			33/58 A
// G 0 1 N	21/64			21/64 Z
			審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 26 頁)	
(21)出願番号 特願平10-91580			(71)出願人 595047385 株式会社分子バイオホトニクス研究所 静岡県浜北市平口5000番地	
(22)出願日 平成10年(1998) 4 月 3 日			(72)発明者 腰本 裕之 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子 バイオホトニクス研究所内	
			(72)発明者 近藤 聡 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子 バイオホトニクス研究所内	
			(72)発明者 石橋 要 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子 バイオホトニクス研究所内	
			(74)代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外 5 名) 最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 RNAの高次構造検出方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、RNAの高次構造検出方法、及びその検出用プローブを提供する。

【解決手段】本発明に係るRNAの高次構造検出方法は、(1)前記RNAと、前記RNAの有する特定の連続する塩基配列A1A2のうちA1とハイブリダイズ可能な塩基配列B1を有するプローブP1と、前記RNAの有する特定の連続する塩基配列A1A2のうちA2とハイブリダイズ可能な塩基配列B2を有するプローブP2とを反応させるステップと、(2)前記RNA上に、前記プローブP1とP2とが連続してハイブリダイズすることにより形成される連続する塩基配列B1B2を検出するステップと、(3)(i)前記連続する塩基配列B1B2が検出される場合は、前記RNAの特定の連続する塩基配列A1A2の高次構造が1本鎖であり、又は(ii)前記連続する塩基配列B1B2が検出されない場合は、前記RNAの特定の連続する塩基配列A1A2の高次構造が2本鎖であると判断するステップからなる。さらに、ヒトc-fos mRNA、ヒトIL-2 mRNA、TMV-L RNAの高次構造検出方法のためのプローブを提供する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 RNA の高次構造を検出する方法であつて、(1)前記 RNA と、

前記 RNA の有する特定の連続する塩基配列 A 1 A 2 のうち A 1 とハイブリダイズ可能な塩基配列 B 1 を有するプローブ P 1 と、前記 RNA の有する特定の連続する塩基配列 A 1 A 2 のうち A 2 とハイブリダイズ可能な塩基配列 B 2 を有するプローブ P 2 とを反応させるステップと、(2)前記 RNA 上に、前記プローブ P 1 と P 2 とが連続してハイブリダイズすることにより形成される連続する塩基配列 B 1 B 2 を検出するステップと、(3)(i)前記連続する塩基配列 B 1 B 2 が検出される場合は、前記 RNA の特定の連続する塩基配列 A 1 A 2 の高次構造が 1 本鎖であり、又は(ii)前記連続する塩基配列 B 1 B 2 が検出されない場合は、前記 RNA の特定の連続する塩基配列 A 1 A 2 の高次構造が 2 本鎖であると判断するステップからなる方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の方法であつて、前記(2)のステップにおいて前記検出が、(a)前記プローブ 1 又は 2 が、一方のプローブが、エネルギードナー蛍光分子でラベル化され、かつ他方のプローブが、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化され、かつ(b)前記プローブ 1 の光励起に基づく蛍光エネルギー移動による前記プローブ 1 及び前記プローブ 2 の蛍光の変化を測定することによることを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、RNA の高次構造を検出する方法、およびその方法を用いて、c-fos mRNA、IL-2 mRNA、およびタバコモザイクウイルス-L 株(TMV-L) RNA の高次構造を検出するためのプローブに関する。

## 【0002】

【従来の技術】RNA 分子の機能の解明については、その 1 次構造である塩基配列のみならず、種々の生理的条件下において有するより高次の構造についても知ることが重要である。すなわち、RNA 分子は、分子内の塩基配列に従い塩基対が形成され、鎖中の一部において 2 本鎖によるステム構造を形成し、また、分子内で塩基対が形成されにくい場合には 1 本鎖として、又は環状 1 本鎖として存在することが知られている(図 2 4)。従って、RNA 分子の構造と機能の関連を解明するためには、特定の条件下での高次構造を検出することが必要であり、RNA の高次構造又はその変化を検出する方法が強く望まれている。

【0003】従来、係る方法の 1 つとして、RNA 分子の固体結晶の構造解析法や、溶液中での RNA 分子の核磁気共鳴吸収スペクトル(NMR)法が知られている。しかし、RNA 分子の固体結晶の構造解析法では、RNA 分子の溶液中でのダイナミックな運動や、平衡現象が解明

されないという問題点があり、また、NMR 法では、比較的小さな RNA 分子のみが測定可能であるという問題点があった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、特定の構造を有する 1 組のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、RNA の高次構造を検出する方法を提供するものである。また、c-fos mRNA、IL-2 mRNA、および TMV-L RNA の高次構造を検出するためのプローブを提供するものである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記従来技術の問題点を解決すべく鋭意研究し、特定の構成を有するプローブを用いることにより、溶液中での RNA 分子の有する高次構造を検出する方法を見出すことに成功し、本発明を完成するに至った。さらに、かかる知見に基づき、c-fos mRNA、IL-2 mRNA、および TMV-L RNA の高次構造を検出するためのプローブを開発することに成功したものである。

【0006】すなわち、本発明は、RNA の高次構造を検出する方法であつて、(1)前記 RNA と、前記 RNA の有する特定の連続する塩基配列 A 1 A 2 のうち A 1 とハイブリダイズ可能な塩基配列 B 1 を有するプローブ P 1 と、前記 RNA の有する特定の連続する塩基配列 A 1 A 2 のうち A 2 とハイブリダイズ可能な塩基配列 B 2 を有するプローブ P 2 とを反応させるステップと、(2)前記 RNA 上に、前記プローブ P 1 と P 2 とが連続してハイブリダイズすることにより形成される連続する塩基配列 B 1 B 2 を検出するステップと、(3)(i)前記連続する塩基配列 B 1 B 2 が検出される場合は、前記 RNA の特定の連続する塩基配列 A 1 A 2 の高次構造が 1 本鎖であり、又は(ii)前記連続する塩基配列 B 1 B 2 が検出されない場合は、前記 RNA の特定の連続する塩基配列 A 1 A 2 の高次構造が 2 本鎖であると判断するステップからなる方法を提供するものである。

【0007】ここで、図 2 4 に模式的に示すように、本発明において RNA の高次構造とは、溶液中において、主に、分子内での塩基対の形成に基づく部分的な 2 本鎖形成(ステム構造ともいう)と、該塩基対形成のない部分の 1 本鎖構造、又は環状 1 本鎖構造(ループ構造という)をいうものとする。係る構造は、溶液の状態(温度、塩濃度等)により特定の平衡状態にあり RNA 分子の運動とともに変動するものである。本発明に係る方法は、上記の所定の条件下での RNA の最もありうる高次構造の検出を可能とするものである(図 1)。さらに、係る所定の条件を変化させた場合に、図 2 に模式的に示すように、その変化に従い RNA の高次構造にも変化が生じるが、本発明に係る方法は、係る RNA の高次構造の変化をも検出可能とするものである。

【0008】さらに、本発明に係る方法は、前記 2 つの



プローブが、RNA上に連続してハイブリダイズして形成したハイブリッド体を検出することを特徴とするが、その検出方法においては特に制限はなく、該ハイブリッド体形成に基づく特有の現象を含むものである。

【0009】すなわち、本発明は、前記の方法であって、前記(2)のステップにおいて前記検出が、(a)前記プローブ1又は2が、一方のプローブが、エネルギードナー蛍光分子でラベル化され、かつ他方のプローブが、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化され、かつ(b)前記プローブ1の光励起に基づく蛍光エネルギー移動による前記プローブ2の蛍光、又はその変化を測定することによることを特徴とする方法を提供するものである。

【0010】本発明において上記のハイブリッド体を検出するための1つの好ましい方法として、図3に模式的に示されるように公知である蛍光エネルギー移動現象を用いるものである。従って、本発明においては、該ハイブリッド体の形成を確認可能であれば、公知の種々の蛍光分子の組合せによる蛍光エネルギー移動現象(USP 4 8 6 8 1 0 3、4 9 9 6 1 4 3、EPO 2 2 9 9 4 3 参照)を利用したものを含むものである。

【0011】また、本発明は、本発明に係る方法を用いて、c-fos mRNAの高次構造を検出するプローブを提供するものである。

【0012】同様に、ヒトIL-2 mRNAの高次構造を検出するプローブを提供するものである。

【0013】さらに、TMV-L RNAの高次構造を検出するプローブを提供するものである。

【0014】かかるプローブは、それぞれのRNAの種々の条件下での高次構造を検出するために用いるものである。すなわち、かかるプローブの一部、又は全部を用いることにより、それぞれのRNA分子のどの位置がステム構造をとっているのか、または、1本鎖やループ構造をとっているのかが検出できるものである。

【0015】以下発明の実施の形態に従い本発明をより詳しく説明する。

【0016】

【発明の実施の形態】ここで、用いる略記号、BODIPY(またはBodipy)はモレキュラープローブス社製品の商標であり、CY5、CY3、CY3.5(またはCy5、Cy3、Cy3.5)はアマーシャム社製品の商標である。

【0017】本発明に係るRNAの高次構造を検出する方法は、図1に模式的に示されているように、RNAの特定の塩基配列(図ではA1A2と示されている)が溶液中で1本鎖、又はループ構造をとっている場合には、本発明に係るプローブ(塩基配列B1とB2を有する)が連続してハイブリダイズ可能となり、従って、該プローブのラベルF1、F2の間に特定の現象が生じることを利用するものである。

【0018】また、RNAの特定の塩基配列(図ではA1A2と示されている)が溶液中で2本鎖構造をとっている場合には、本発明に係るプローブ(塩基配列B1とB2を有する)が連続してハイブリダイズすることが困難となり、従って上記の特定の現象が生じないこととなる。

【0019】さらに、上記特定の現象として、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)現象を利用した例が図3に示されている。すなわち、本発明に係るプローブが連続してRNAにハイブリダイズした際、各プローブにラベルされた蛍光色素間にFRETが生じ、蛍光スペクトルの変化が観測されることとなる。

【0020】さらに、本発明に係る方法は、RNAが溶液中で種々の条件の下でその高次構造が変化する際の該高像変化をモニターする以下に本発明についてより詳しく説明する。

【0021】(RNAの高次構造)本発明に係るRNAの高次構造は、溶液中に一定の構造として存在するものではなく、存在する条件に従い、例えば溶液中、特定の条件下で存在するものも含む。具体的には、同じRNAであっても、特定の温度、塩濃度、溶媒の組成等によりその最もあり得る高次構造は変動するものであり、本発明にかかる方法はこのような変動する高次構造もまた検出可能とするものである。

【0022】またRNAについては、その種類、構造、および長さ等において特に制限はない。例えば、tRNA、mRNA、rRNA、さらには合成されたリボヌクレオチドが含まれる。さらに、RNAはそのすべてが核酸構造を有する必要もなく、末端部に他の成分を有するものでもよい。

【0023】本発明に係る方法においては、高次構造を検出されるべき部分のRNAの塩基配列が知られていることが必要である。すなわち、係る既知の塩基配列の従い、本発明で使用するプローブの塩基配列を決定するからである。

【0024】前記目的のために、RNAの塩基配列を決定する方法としては、公知の塩基配列決定方法が好適に使用できる(例えば、マキシム・ギルバート法、チエインターミネーター法(サンガー法)(dideoxy-mediated chain-termination method for DNA sequencing)等が使用可能である。

【0025】(検出方法)本発明に係るRNAの高次構造検出方法は、該RNA上の高次構造を検出するべき位置にある塩基配列A1A2に連続してハイブリダイズする1組のプローブP1、P2であって、それぞれA1、A2と相補的な塩基配列B1、B2を有するものを用いるものである。

【0026】いま、該RNAの当該塩基配列部分A1A2が所定の条件下で、1本鎖又は環状1本鎖(ループ)の高次構造をとっている場合は、上記プローブを加える

ことで容易に2本鎖（ハイブリッド体）を形成し易い。  
または、該RNAの当該塩基配列部分A 1 A 2が所定の条件下で、2本鎖（ステム）の高次構造をとっている場合は、上記プローブを加えるだけでは、容易に該ステム構造から2本鎖（ハイブリッド体）を形成することは難しい。

【0027】従って、係るプローブによるハイブリッド体形成は、上記プローブの2つの塩基配列B 1とB 2が、RNA上で連続して（B 1 B 2）ハイブリッド体を形成していることとなる。係る連続する塩基配列B 1 B 2を何等かの手段で特異的に検出することにより、該RNAの部分の高次構造が検出されることとなる。

【0028】また、係る連続する塩基配列B 1 B 2を特異的に検出する方法については、本発明は特に制限はされない。塩基配列B 1とB 2が連続してハイブリダイズする際のみ特異的に特定の現象を生じる公知の手段を含めて種々の手段を用いることが可能である。

【0029】具体的には、以下にまとめるように、塩基配列B 1とB 2を有するプローブP 1とP 2にそれぞれラベル基を結合し、該ラベル基間で、塩基配列B 1とB 2が連続してハイブリダイズする際のみ特異的な現象を生じるものが好ましい。

【0030】(1) 蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を利用したものである。すなわち、本発明に係るプローブは1組のプローブであって、1つのプローブはエネルギードナー性の蛍光分子でラベル化され、他方はエネルギーアクセプター性の蛍光分子でラベル化されているものである。また、これらのプローブは連続してRNAにハイブリダイズした際、蛍光共鳴エネルギー移動が効率よく生じるような空間位置をとる分子構造を有している。従って、これらのプローブとRNAとのハイブリッド体に光照射によりエネルギードナー蛍光分子を励起した際にエネルギーアクセプター性の他の蛍光分子へ移動してエネルギーアクセプター蛍光分子からの蛍光が観測される（図3）。

【0031】この場合、エネルギーアクセプター蛍光分子からの蛍光の蛍光強度を測定し、上記の蛍光エネルギー移動が生じているか否かがわかるものである。また、このエネルギー移動が生じている場合は、2つのプローブが連続してRNAにハイブリダイズし得ることを示す。すなわち、RNAの該部分が1本鎖、又はループ構造であることを知ることとなる。本発明に係る1組のプローブは、上記の蛍光エネルギー移動が効率的に生じるように空間配置されるべく構成されるものである。

【0032】従って、本発明に係る方法を使用することで、極めて高感度に、RNAの高次構造を検出することが可能となる。

【0033】さらに、上記エネルギーアクセプター蛍光分子からの蛍光の蛍光強度を定量的に測定することにより、2つのプローブが連続してRNAにハイブリダイズ

する容易さを測定することが可能である。この場合、種々の溶液の条件下でのRNAの該部分での高次構造の安定性についての評価が得られることとなる。

【0034】(2)エキシマーおよびエキサイプレックスの形成により生じる蛍光を利用したものである。すなわち、励起状態にある一方の色素と基底状態にある他方の色素分子が複合体を形成することにより生じる現象を利用するものである。これらの色素で標識された2種類1組のプローブは、RNAに連続してハイブリダイズした際、エキシマーまたはエキサイプレックスが効率よく形成されるような空間配置をとる分子構造を有している。従って、これらのプローブとRNAとのハイブリッド体に光照射をすることにより、エキシマーまたはエキサイプレックス由来の蛍光の強度が観測される。この場合、これらのエキシマーまたはエキサイプレックス由来の蛍光強度を測定することにより、2種類のプローブがRNAの当該部位にハイブリダイズし得るか否かがわかるものである。すなわち、RNAの該部分が1本鎖、又はループ構造であるか2本鎖であるかを知ることとなる。本発明に係る1組のプローブは、上記のエキシマー蛍光が効率的に生じるように空間配置されるべく構成されるものである。従って、本発明に係る方法を使用することで、極めて高感度に、RNAの高次構造を検出することが可能となる。

【0035】さらに、上記エキシマー蛍光の蛍光強度を定量的に測定することにより、2つのプローブが連続してRNAにハイブリダイズする容易さを測定することが可能である。この場合、種々の溶液の条件下でのRNAの該部分での高次構造の安定性についての評価が得られることとなる。

【0036】（プローブ）本発明において使用する上記1組のプローブは、RNAの高次構造を検出するべき部分の塩基配列A 1 A 2と相補的な塩基配列であるB 1とB 2を有するものである。

【0037】また、RNAの高次構造を検出するべき部分が複数有る場合には、同様にそれぞれの部分のRNAの塩基配列に相補的な1組のプローブを複数使用すればよい。RNAの全配列においてその高次構造を検出する場合においても同様に可能である。係る場合、例えば、上記の複数のプローブの組を、別々の区分した溶液（具体的にはタイタープレート）に加え、それぞれの溶液にRNAを加えることにより、迅速にかつ簡便に全RNAの高次構造が検出される。また、係る溶液に温度等の変更を加えることで迅速にかつ簡便に全RNAの高次構造の変化が検出されることとなる。

【0038】各プローブの塩基配列数には特に制限はない。RNAの塩基数、高次構造、溶液の条件等により適宜選択可能である。該塩基配列数が多い場合は、ハイブリダイズ形成による2重鎖は安定となるが、一方得られる高次構造の情報は少なくなる。また、該塩基配列数が

少ない場合は、ハイブリダイズ形成による2重鎖は不安定となる。従って、通常は10～40塩基であればよく、好ましくは15～30塩基である。さらに、各プローブの合計の塩基配列数も特に限定はない。一般的にはハイブリダイズ形成した2重鎖が充分安定であり、かつ誤認識のない十分な長さが必要であり、この目的では20～50塩基が好ましく、さらには20～40塩基以上が好ましい。

【0039】（プローブの調製）上記説明した本発明に係る検出用プローブのオリゴヌクレオチド配列部を調製する方法においては特に制限はない。公知の核酸合成方法が好ましく使用可能である。特に種々の固相合成方法に基づく自動合成方法が好ましく、例えばアミダイト、トリエステル等の合成法が好ましく用いられる（丹羽峰雄著、化学と生物実験ライン、DNAの化学合成法、廣川書店、平成4年）。さらに、プローブ中に蛍光分子を結合するための好ましいリンカー部を導入する方法は種々のポリペプチド修飾用試薬を用いることで可能である。

【0040】本発明においては、特に5'末端アミノ化用試薬である6-（トリフルオロアセチルアミノ）ヘキシル-（2-シアノエチル）-（N,N-ジイソプロピル）-ホスホロアミダイトを、上記化学合成時に同時に

使用できる。これによりオリゴヌクレオチド鎖の任意の位置にヘキシルアミノ基（トリフルオロアセチル基を除いた後）を導入可能となる。

【0041】また、リンカー部の位置およびリンカー部の長さの選択により、2種類の蛍光分子が好ましい相対的空間配置をとるうるプローブを調製するために、その空間配置を推定するための種々の分子モデルや、分子モデルコンピュータプログラム等が使用可能である。

【0042】リンカー部と必要な蛍光分子の結合方法、または該リンカー部をオリゴヌクレオチドプローブの適当な位置の塩基に結合する方法については、特に制限はなく、化学合成方法により、または酵素による方法等が使用可能である。

【0043】以下実施例に従い本発明を説明するが、実施例に制限されることはない。

#### 【0044】

【実施例】（1）蛍光標識オリゴDNAプローブの合成  
（1-1）オリゴDNAの合成

以下の塩基配列をもつオリゴDNAを、DNA/RNAシンセサイザー（Perkin Elmer: Model 394 または Perseptive: Model 18909）を用いて、βシアノエチルアミダイト法により合成した。

#### 【0045】

```

F1: 5' -XTCTAGTTGGTCTGTC-3'
F2: 5' -XCTTCTAGTTGGTCTG-3'
F3: 5' -XATCTTCTAGTTGGTC-3'
F4: 5' -XCTCATCTTCTAGTTG-3'
F5: 5' -GCAGACTTCTCYATCT-3'
F6: 5' -AAGCAGACTTCTCAT-3'
F7: 5' -CAAAGCAGACTYTCTC-3'
F8: 5' -CTGCAAAGCAGYACTT-3'
L1: 5' -XATTATTAATTCCATT-3'
L2: 5' -XGTAAACTTAAATGT-3'
L3: 5' -XGATCCCTTTAGTTCC-3'
L4: 5' -XTAGAAGGCCTGATA-3'
L5: 5' -XCATTCAACATAATAA-3'
L6: 5' -TTTGGGATTCTYTGTA-3'
L7: 5' -GGCCTTCTTGGYGCAT-3'
L8: 5' -ATGAATGTTGTYTTCA-3'
L9: 5' -AATATTTAAAYTAAA-3'
L10: 5' -AGATACTATATYTAA-3'
T1: 5' -XGCCATTGTAGTTGTA-3'
T2: 5' -XTCCATCTTTGAGCAA-3'
T3: 5' -XCATGTCTAATAAGTAA-3'
T4: 5' -XATACACAATCGTTTG-3'
T5: 5' -XCTTTGTTGTAATACC-3'
T6: 5' -XCTCATCAACAACCTTC-3'
T7: 5' -XATCTTGCAATGCTAG-3'
T8: 5' -GCTGTTTGTGTGTAT-3'
T9: 5' -ACTAACGTGTGYGTTTC-3'

```



T10: 5' - CTGCATCTACTTGTGTA - 3'  
 T11: 5' - TGATTTTCTTTGYAATG - 3'  
 T12: 5' - GTTCTTTTCTGYCATC - 3'  
 T13: 5' - AACATTCTCCAYTGAA - 3'  
 T14: 5' - AGAAGCCTTTTYCAGA - 3'

上記で、Xは、6-（トリフルオロアセチルアミノ）ヘキシル-（2-シアノエチル）-（N、N-ジイソプロピル）-ホスホロアミダイト（TFAcヘキサノールアミンリンカー、パーキンエルマージャパン：Cat No.400808）を、Yは、Uni-Link AminoModifier（CLONTECH Laboratories Inc. Code No.CL5190-1）を示す。

【0046】それぞれ得られた反応物を、イオン交換高速液体クロマトグラフで分離し、主ピークを分取した。イオン交換高速液体クロマトグラフに用いた条件は、東ソー社製カラム：TSK-GEL DEAE-2WS（4.6mm内径 x 250mm全長）を使用し、流速0.8ml/分、温度40度、移動相はHCOOHNH<sub>4</sub> 勾配-20%CH<sub>3</sub>CNであり、260nmの吸収で検出した。HCOOHNH<sub>4</sub> 勾配は、A液：0.2M HCOOHNH<sub>4</sub>、B液：1M HCOOHNH<sub>4</sub>の2つの液の混合比を変えることで作成した。B液の比率：35%-85%/20分の勾配を使用した。

【0047】分取した液を脱塩した後、凍結乾燥した。

【0048】（1-2）オリゴDNAのBodipy493/503標識

上記で合成したオリゴDNA（F1、F2、F3、F4、L1、L2、L3、L4、L5、T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7）をBodipy493/503で標識した。

【0049】NHSS（N-Hydroxysulfosuccinimide, Sodium Salt）2.5mgを30マイクロリットルの滅菌水に、EDAC（1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide）5mgを50マイクロリットルの滅菌水にそれぞれ溶解した。これらと、Bodipy493/503 プロビオン酸（Molecular Probes Inc.）1mgを50マイクロリットルDMFに溶解したものを混合し、室温で30分間反応させた。得られた溶液を、乾固したオリゴDNAを0.5M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>/NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>緩衝液（pH9.3）300マイクロリットルに溶解したものと混合し、遮光して一晚反応させた。反応液をゲル濾過して未反応の色素を除去した後、逆相高速液体クロマトグラフにより反応物を精製した。逆相高速液体クロマトグラフに用いた条件は、資生堂社製カラム、CAPCELL PAKC18（6mm内径 x 250mm全長）を使用し、流速1ml/分、温度40度、移動相はCH<sub>3</sub>CN 勾配-5mMTEAA、であり、260nmの吸収で検出した。CH<sub>3</sub>CN 勾配は、A液：5%CH<sub>3</sub>CN、B液：40%CH<sub>3</sub>CNの2つの溶液の混合比を変えることで作成した。B液の比率：30%-80%/20分の勾配を使用した。分取したピークの吸収スペクトルを測定し、260nmの吸収と蛍光色素の吸収（493nm）を確認した。これらを凍結乾燥して保存した。

【0050】

F662D（F1のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) TCTAGTTGGTCTGTC - 3'  
 F664D（F2のBodipy493/503標識体）  
 5' - (Bodipy493/503-X) CTTCTAGTTGGTCTG - 3'  
 F666D（F3のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) ATCTTCTAGTTGGTC - 3'  
 F669D（F4のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) CTCATCTTCTAGTTG - 3'  
 L183D（L1のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) ATTATTAATTCCATT - 3'  
 L228D（L2のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) GTAAACTTAAATGT - 3'  
 L389D（L3のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) GATCCCTTTAGTTCC - 3'  
 L536D（L4のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) TAGAAGGCTGATA - 3'  
 L715D（L5のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) CATTCAACATAATAA - 3'  
 T62D（T1のBodipy493/503標識体）：  
 5' - (Bodipy493/503-X) GCCATTGTAGTTGTA - 3'  
 T2514D（T2のBodipy493/503標識体）：



5' - (Bodipy493/503-X) TCCATCTTTGAGCAA-3'  
 T3380D (T3のBodipy493/503標識体) :  
 5' - (Bodipy493/503-X) CATGTCTAATAAGTAA-3'  
 T4038D (T4のBodipy493/503標識体) :  
 5' - (Bodipy493/503-X) ATACACAATCGTTTG-3'  
 T5281D (T5のBodipy493/503標識体) :  
 5' - (Bodipy493/503-X) CTTTGTTGTAAATACC-3'  
 T5479D (T6のBodipy493/503標識体) :  
 5' - (Bodipy493/503-X) CTCATCAACAACCTTC-3'  
 T1926D (T7のBodipy493/503標識体) :  
 5' - (Bodipy493/503-X) ATCTTGCAATGCTAG-3'

(1-3) オリゴDNAのCy5標識  
 オリゴDNA (F5、F6、F7、F8、L6、L7、  
 L8、L9、L10、T8、T9、T10、T11、T  
 12、T13、T14) を Cy5色素で標識した。  
 【0051】 1チューブのCy5色素 (Amersham、FluoroL  
 ink Cat.No. PA25001) を 100マイクロリットルの滅  
 菌水に溶解した。これを、乾固したオリゴDNAを0.  
 5MNa<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>/NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>緩衝液 (pH9.3)  
 200マイクロリットルに溶解した溶液と混合し、遮光  
 して一晩反応させた。反応液をゲル濾過して未反応の色  
 素を除去した後、逆相高速液体クロマトグラフにより反  
 応物を精製した。逆相高速液体クロマトグラフに用いた

条件は、資生堂社製カラム、CAPCELLPAKC1  
 8 (6mm内径 x 250mm全長) を使用し、流速1m  
 l/分、温度40度、移動相はCH<sub>3</sub>CN勾配-5mM  
 TEAA、であり、260nmの吸収で検出した。CH  
 3CN勾配は、A液: 5%CH<sub>3</sub>CN、B液: 40% C  
 H<sub>3</sub>CNの2つの溶液の混合比を変えることで作成し  
 た。B液の比率: 15%-60%/20分の勾配を使用  
 した。分取したピークの吸収スペクトルを測定し、26  
 0nmの吸収と蛍光色素の吸収 (493nm) を確認し  
 た。これらを凍結乾燥して保存した。

【0052】

F677A (F5のCy5標識体) :  
 5' - GCAGACTTCTC (Y-Cy5) ATCT-3'  
 F679A (F6のCy5標識体) :  
 5' - AAGCAGACTTC (Y-Cy5) TCAT-3'  
 F681A (F7のCy5標識体) :  
 5' - CAAAGCAGACT (Y-Cy5) TCTC-3'  
 F684A (F8のCy5標識体) :  
 5' - CTGCAAAGCAG (Y-Cy5) ACTT-3'  
 L198A (L6のCy5標識体) :  
 5' - TTTGGGATTCT (Y-Cy5) TGTA-3'  
 L243A (L7のCy5標識体) :  
 5' - GGCTTCTTGG (Y-Cy5) GCAT-3'  
 L404A (L8のCy5標識体) :  
 5' - ATGAATGTTGT (Y-Cy5) TTCA-3'  
 L550A (L9のCy5標識体) :  
 5' - AATATTTAAA (Y-Cy5) TAAA-3'  
 L730A (L10のCy5標識体) :  
 5' - AGATACTATAT (Y-Cy5) TTAA-3'  
 T77A (T8のCy5標識体) :  
 5' - GCTGTTTGTGT (Y-Cy5) GTAT-3'  
 T2529A (T9のCy5標識体) :  
 5' - ACTAACGTGTG (Y-Cy5) GTTC-3'  
 T3396A (T10のCy5標識体) :  
 5' - CTGCATCTACTT (Y-Cy5) TGTA-3'  
 T4053A (T11のCy5標識体) :  
 5' - TGATTTTCTTTG (Y-Cy5) AATG-3'  
 T5296A (T12のCy5標識体) :

5' -GTTCTTTTCTG (Y-Cy 5) CATC-3'  
 T5494A (T13のCy 5標識体) :  
 5' -AACATTCTCCA (Y-Cy 5) TGAA-3'  
 T1941A (T14のCy 5標識体) :  
 5' -AGAAGCCTTTT (Y-Cy 5) CAGA-3'

## (2) ヒトIL-2RNAの調製

ヒトIL-2 cDNAを有するプラスミドDNA、pTCGF-II (ATCC #39673、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81,2543-2547,1984) より制限酵素pst Iで切り出したIL-2 cDNA断片を、RNA合成用ベクターpBluescript KS(+)のpst I消化部位に

T3プロモーター下流に同cDNAが位置するようにライゲーションキット (タカラ) を用いて連結した。得られた組換え体プラスミドを大腸菌JM109株のコンピテントセル (タカラ) に導入し、得られた同大腸菌の形質転換体を培養し、100 mlの同培養液からPlasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて46.2  $\mu$ gのプラスミドDNAを抽出・精製した。

【0053】同組換え体プラスミドを制限酵素Sma I消化により線状化し、同プラスミド溶液中に存在する蛋白質をproteinase Kで分解後、フェノール・クロロホルムを用いて変性・除去した。

【0054】この精製遺伝子断片 (0.66  $\mu$ g) を鋳型として、RNAを構成する各塩基の組成をA:C:G:U=3.5:1.8:1.4:3.2としたT3 RNAポリメラーゼ溶液をインビトロ転写反応キット (Megascript T3 Kits、Ambion社) を用いて調製し、37°Cで6時間ポリメラーゼ反応を行い、ヒトIL-2 cDNAを鋳型としたIL-2RNAを合成した。反応終了後、DNase I (同キット、Ambion社) で鋳型DNAを分解し、転写反応溶液中の蛋白質をフェノール・クロロホルムを用いて変性・除去した。得られたRNA溶液にイソプロパノールを2倍容加え、遠心 (14krpm、7分間) による沈殿物としてヒトIL-2 RNAを回収し、未反応の酵素反応基質である各ヌクレオチド等低分子物質を除去した。70%エタノールで1回すすいだRNA沈殿物 (139  $\mu$ g) をRNase free water (同キット、Ambion社) で溶かし、5  $\mu$ g/ $\mu$ lのRNA溶液を調製し、以降のハイブリダイゼーション実験に使用した。

## 【0055】(3) TMV-LゲノムRNAの調製

TMV-LゲノムRNAは、TMV-Lの全配列6384塩基のcDNAを含むプラスミド:pLFW3 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,83,5043-5047,1986) のP<sub>m</sub>プロモーターをT7プロモーターに置き換えたpTLW3 (Bio/Tech.,11,930-932,1993、Molecular pathology of tobacco mosaic virus revealed by biologically active cDNAs,p.149-186.In: Genetic Engineering with Plant Viruses.Wilson,T.M.A.and Davis,J.W. (Eds.) ,CRC Press,Boca Raton,FL.) を鋳型とし、インビトロ転写RNA合成反応により調製した。すなわち、pTLW3を制限酵素Mlu Iで直鎖状に切断し、TMV-LのcDNAの直前に位置するT7プロモーターにT7 RNA ポリメラーゼを作用させることによりゲノム

RNAを合成した。

【0056】合成には、T7プロモーター用のインビトロ転写反応キット (MEGAscript T7Kits、Ambion社) を用いた。なお今回の合成には、キャップ構造 (m7G(5')pp(5')G:Cap Analog) は付加しておらず、またMlu Iで直鎖状に切断した末端が平滑末端でないため、合成されたRNAは本来のTMV-L RNAより3塩基 (CGC) 余分の配列が付加されたものである。

【0057】合成されたTMV-L RNAの抽出・精製は、インビトロ転写反応キット (MEGAscriptT7 Kits、Ambion社) 添付試薬及びそのキットの方法に準じた。すなわち、インビトロ転写反応後、反応液にDNase Iを0.1U/ $\mu$ lになるように添加し、37°Cで30分反応させて鋳型のDNAを分解した。その後、Ammonium Acetate Stop Solution (5M Ammonium Acetate,100mM EDTA) を、各々の最終濃度が、0.5M Ammonium Acetate,10mM EDTAとなる様に加えDNase Iの反応を停止させた。反応停止後、フェノール/クロロホルム、クロロホルム抽出を行った後、イソプロピルアルコール沈殿を行いTMV-L のRNAを回収した。

## 【0058】(4) ヒト c-fosRNAの調製

ヒトc-fos遺伝子のRNAは、c-fos遺伝子DNAを含む一本鎖DNAを鋳型としてインビトロ転写RNA合成反応により調製した。

【0059】ヒトc-fos遺伝子のコード領域 (2100塩基) を含むプラスミド:pSPT-c-fos (理研 Gene bank) を、T3プロモーターを有する pBluescript プラスミドベクターの下流に組替えたプラスミド:pBlue-c-fosを構築した。この pBlue-c-fosプラスミドを大腸菌JM109株にトランスフォームし、トランスフォームされた大腸菌JM109株を大量培養して pBlue-c-fosプラスミドを大量に増幅させた。その後、大腸菌JM109株より pBlue-c-fos プラスミドを抽出・精製した。精製した pBlue-c-fos プラスミドを制限酵素SmaIで消化して、インビトロ転写RNA合成反応に用いる鋳型とした。インビトロ転写RNA合成反応による c-fos RNAの合成は、鋳型DNAに含まれる c-fosDNAの上流に位置するT3プロモーターにT3 RNA ポリメラーゼを作用させることにより行った。合成には、合成には、T3プロモーター用のインビトロ転写反応キット (MEGAscriptT3 Kits、Ambion社) を用いた。得られたRNA溶液にイソプロパノールを2倍容加え、遠心 (14krpm、7分間) による沈殿物としてヒトc-fos RNAを回収し、未反応の酵素反応基質である各ヌクレオチド等低分子物質を除去した。70%エタノールで1回すすいだRNA沈殿物 (13

9  $\mu$ g) をRNase free water (同キット、Ambion社) で溶かした。

【0060】 (5) アフリカツメガエル転写伸長因子遺伝子 (XELF1- $\alpha$ ) のRNAの調製

アフリカツメガエル転写伸長因子遺伝子 (XELF1- $\alpha$ ) のRNAは、XELF1- $\alpha$  遺伝子DNAを含む一本鎖DNAを鋳型としてインビトロ転写RNA合成反応により調製した。

【0061】 インビトロ転写反应用キット (MEGAscript T3 kit、Ambion社) に添付されているプラスミド: linearized TRIPLEscript plasmidを制限酵素EcoRIで処理して約1800塩基の長さの XELF1- $\alpha$  DNAを切り出した。このDNA断片を、制限酵素EcoRI処理により直鎖状にしておいたプラスミド: pBluescript II KS (+) (STRATAGENE社製) にサブクローニングし、XELF1- $\alpha$  DNAを含むプラスミド: pBlue XELF1- $\alpha$ を得た (約4760塩基)。得られた pBlue XELF1- $\alpha$ を制限酵素SmaIで直鎖状に切断し、これをインビトロ転写RNA合成反応の鋳型とした。インビトロ転写RNA合成反応による XELF1- $\alpha$  RNAの合成は、鋳型DNAに含まれるXELF1- $\alpha$  DNAの上流に位置するT3プロモーターにT3 RNAポリメラーゼを作用させることにより行った。合成には、T3プロモーター用のインビトロ転写反应用キット (MEGAscript T3 Kits、Ambion社) を用いた。合成された XELF1- $\alpha$  の抽出・精製は、QIAGEN Total RNA Kits (QIAGEN社) を用い、その方法はキットの方法に準じた。

【0062】 (6) 細胞からのmRNA混合物の抽出  
Cos7細胞をグアニジン塩酸処理して細胞を破碎した。この細胞破碎液を Oligod(T) ラテックスビーズ (ロッシュ) で処理して、polyARNAをアフィニティー精製した。

【0063】 (7) 蛍光スペクトルの測定  
各蛍光標識オリゴDNAプローブを含む水溶液の蛍光スペクトルを以下の条件で測定した。

【0064】

蛍光分光光度計: 日立 F4500

励起波長: 480 nm

蛍光測定波長: 500-750 nm

カラム: TSK gel DEAE-NPR (内径4.6 mm x 全長3.5 cm)

)

(東ソー)

流速: 1 ml / 分

温度: 25度

移動相: A液: 20 mM Tris-HCl, pH 9.0

B液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl pH 9.0

A液とB液を混合することにより、NaCl 濃度のリニアグラジエントを作製

0.125 M - 0.5 M / 10分

検出は紫外吸収 (260 nm) および蛍光強度にて行った。蛍光強度による検出の条件は、オリゴDNAプローブに標識されている蛍光色素が Bodipy493/503のときに

温度: 室温

(7-1) ターゲットRNAが IL-2 RNAのとき

蛍光標識オリゴDNAプローブの蛍光スペクトルは、1xSSC

(15mM Sodium citrate, 150mM NaCl; pH7.0) 中で濃度300 nMで測定した。また、各蛍光標識オリゴDNAプローブとIL-2 RNAとを混合させた試料の蛍光スペクトルを測定するには、モル比1:1 (プローブおよびRNAの濃度はそれぞれ300 nM) で1xSSC中で混合して室温で15分間放置した後に蛍光スペクトルを測定した。

【0065】 (7-2) ターゲットRNAが TMV-L RNAのとき

蛍光標識オリゴDNAプローブの蛍光スペクトルは、1xSSC緩衝液中で濃度 330 nM で測定した。また、各蛍光標識オリゴDNAプローブと TMV-L RNAとを混合させた試料の蛍光スペクトルを測定するときには、モル比1:1 (プローブおよびRNAの濃度は各々 330 nM) で1xSSC緩衝液中で混合して室温で30分間以上放置した後に蛍光スペクトルを測定した。

【0066】 (7-3) ターゲットRNAが c-fos RNAのとき

蛍光標識オリゴDNAプローブの蛍光スペクトルは、1xSSC緩衝液中で濃度 250 nM で測定した。また、各蛍光標識オリゴDNAプローブとc-fosRNAとを混合させた試料の蛍光スペクトルを測定するときには、モル比1:1 (プローブおよびRNAの濃度は各々 250 nM) で1xSSC緩衝液中で混合して室温で30分間放置した後に蛍光スペクトルを測定した。

【0067】 (8) 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

各蛍光標識オリゴDNAプローブとRNA (c-fosRNAまたはIL-2RNAまたはxelf1- $\alpha$  RNA) とをモル比1:1 (プローブおよびRNAの濃度は各々 250 nM) で0.15 M NaCl、0.015 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0 中で混合して室温で30分間放置した。その後、以下の条件のHPLCにより、RNAと結合した蛍光標識オリゴDNAプローブと結合しない蛍光標識オリゴDNAプローブとを分離した。

【0068】

は励起波長475 nm / 蛍光測定波長515 nm、オリゴDNAプローブに標識されている蛍光色素がCy5のときには励起波長650 nm / 蛍光検出波長667 nm



である。

【0069】 (9) IL-2RNAの2次構造の検索  
IL-2RNAは全長 801塩基の一本鎖RNAである。このRNAの2次構造を調べるために、以下の5組の蛍光標識オリゴDNAプローブを使用した。蛍光標識オリゴDNAプローブは、Bodipy493/503 で標識されたオリゴDNA 1種類とCy5で標識されたオリゴDNA 1種類の2種類1組として実験に使用した。これら5組のプローブはいずれもIL-2RNAのそれぞれ特定の30塩基の部位に、2種類のプローブが連続してハイブリダイズすることが可能な塩基配列をもっている。

【0070】 (1) . L183Dプローブ と L198Aプローブ  
L183DプローブはIL-2 RNAの 183 塩基-197 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、L198AプローブはIL-2 RNAの 198 塩基-212 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0071】 (2) . L228Dプローブ と L243Aプローブ  
L228DプローブはIL-2 RNAの 228 塩基-242 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、L243AプローブはIL-2 RNAの 243 塩基-257 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0072】 (3) . L389D プローブ と L404A プローブ  
L389D プローブは IL-2RNAの 389 塩基-403 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、L404Aプローブは IL-2RNAの404 塩基-418 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0073】 (4) . L536D プローブ と L550A プローブ  
L536Dプローブは IL-2RNAの 536 塩基-549 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、L550AプローブはIL-2RNAの 550 塩基-563 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0074】 (5) . L715Dプローブ と L730Aプローブ  
L715DプローブはIL-2 RNAの 715 塩基-729 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、L730AプローブはIL-2RNAの 730 塩基-744 塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0075】 5組のプローブそれぞれについて、2種類1組のプローブをモル比1:1の比率で混合して蛍光スペクトルを測定した。さらに、この溶液に、プローブに対してモル比1:1の比率になるようにIL-2 RNAを加えて室温で反応させた後、蛍光スペクトルを測定し、スペクトルの変化を観察した(図4~8)。その結果、(2)の組み合わせ(L228D と L243A)を使用したとき

には、IL-2RNAを添加すると、Bodipy493/503の蛍光(波長 515 nm 近辺にピークをもつ蛍光)強度が減少し、Cy5の蛍光強度(波長 670 nm にピークをもつ蛍光)が増大した。これは、2種類のプローブがIL-2RNAの 228-257 の部位にお互いに連続してハイブリダイズすることによって、2つの蛍光色素(Bodipy493/503とCy5)間の距離が接近したため、Bodipy493/503とCy5の間で共鳴エネルギー移動が起きたことを示す。

(1)の組み合わせ(L183D と L197A)、および(3)の組み合わせ(L389D と L403A)を使用したときについても同様の蛍光スペクトルの変化が認められたが、変化量は(2)の組合せと比較して少なかった。また、(4)の組み合わせ(L536D と L550A)、および(5)の組み合わせ(L715D と L730A)を使用したときには蛍光スペクトルはほとんど変化しなかった。

【0076】 L228D、L243A、L715D、L730Aの4つのプローブについて、それぞれ IL-2RNAとモル比1:1で混合した後、HPLCにより、IL-2RNAと結合したプローブと結合しなかったプローブとを分離した(図9)。保持時間5分に遊離のプローブが、保持時間7.5分に IL-2RNAおよび IL-2RNAとハイブリダイズしたプローブがそれぞれ溶出される。実験の結果、L228D、L243A、L715D、L730Aはそれぞれ、35%、16%、20%、2%のプローブが IL-2RNAの位置に溶出された。すなわち、IL-2RNAとハイブリダイズしたプローブの比率はそれぞれ 35%、16%、20%、2%である。

【0077】 これらの結果は、蛍光スペクトルの変化量と2種類のプローブそれぞれの標的RNAとのハイブリダイゼーションの比率の積は相関していることを示している。すなわち、2種類の蛍光標識オリゴDNAプローブと標的RNAとの混合物の蛍光スペクトルの測定から、標的RNAの特定部位が、溶液中に混在している相補的な塩基配列をもつ他の核酸とどの程度ハイブリッド体を形成しやすい性質をもっているかを知ることができる。

【0078】 (10) TMV-LRNAの2次構造の検索  
TMV-LRNAは全長 6384塩基の一本鎖RNAである。このRNAの2次構造を調べるために、以下の7組の蛍光標識オリゴDNAプローブを使用した。蛍光標識オリゴDNAプローブは、Bodipy493/503 で標識されたオリゴDNA 1種類とCy5で標識されたオリゴDNA 1種類の2種類1組として実験に使用した。以下の7組の組み合わせを用いた。これら7組のプローブはいずれもTMV-LRNAのそれぞれ特定の30~32塩基の部位に、2種類のプローブが連続してハイブリダイズすることが可能な塩基配列をもっている。

【0079】 (1) . T62Dプローブ と T77Aプローブ  
T62DプローブはTMV-LRNAの 62塩基-76塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、T77AプローブはTMV-LRNAの77塩基-

91塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0080】(2) . T2514DプローブとT2529Aプローブ

T2514DプローブはTMV-LRNAの2514塩基-2528塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、T2529AプローブはTMV-LRNAの2529塩基-2543塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0081】(3) . T3380DプローブとT3396Aプローブ

T3380DプローブはTMV-LRNAの3380塩基-3395塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、T3396AプローブはTMV-LRNAの3396塩基-3411塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0082】(4) . T4038DプローブとT4053Aプローブ

T4038DプローブはTMV-LRNAの4038塩基-4052塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、T4053AプローブはTMV-LRNAの4053塩基-4068塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0083】(5) . T5281DプローブとT5296Aプローブ

T5281DプローブはTMV-LRNAの5281塩基-5295塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、T5296AプローブはTMV-LRNAの5296塩基-5310塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0084】(6) . T5479DプローブとT5494Aプローブ

T5479DプローブはTMV-LRNAの5479塩基-5493塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、T5494AプローブはTMV-LRNAの5494塩基-5508塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0085】(7) . T1926DプローブとT1941Aプローブ

T1926DプローブはTMV-LRNAの1926塩基-1940塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、T1941AプローブはTMV-LRNAの1941塩基-1955塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0086】7組のプローブそれぞれについて、2種類1組のプローブをモル比1:1の比率で混合して蛍光スペクトルを測定した。さらに、この溶液に、プローブに対してモル比1:1の比率になるようにTMV-LRNAを加えて室温で反応させた後、蛍光スペクトルを測定し、スペクトルの変化を観察した(図10~16)。その結

果、(1)のプローブの組み合わせを使用したときには、TMV-LRNAを加えるとBodipy493/503の蛍光強度が減少しCy5の蛍光強度が増大するというスペクトル変化が観察された。(5)のプローブの組み合わせを使用したときには、(1)のプローブ組み合わせを使用したときと同様の変化が観察されたが、変化量は(1)を使用したときよりも少なかった。また、(2)(3)

(4)(6)(7)のプローブ組み合わせを使用したときには、スペクトル変化はほとんど観察されなかった。【0087】また、(1)のプローブ組み合わせとXELF1-αRNAとを混合して蛍光スペクトル変化を測定したところ、TMV-LRNAを加えたときに生じたようなスペクトル変化は観察されなかった。すなわち、(1)のプローブ組み合わせとTMV-LRNAとを混合したときに生じた蛍光スペクトル変化は、標的RNAとしてTMV-LRNAを使用したときに特異的な変化であった。

【0088】これらの結果から、本実施例で実験した条件下(室温、生理的塩濃度など)では、62-91塩基の部位は、溶液中に混在している他の相補的な塩基配列をもつ核酸とハイブリッド体をつくりやすい性質をっており、一方、1926-1955塩基の部位などはあまりハイブリッド体をつくらぬ性質をもっていることがわかる。

【0089】(11)c-fosRNAの2次構造の検索c-fosRNAは全長2094塩基の一本鎖RNAである。まず以下の蛍光標識オリゴDNAプローブを作製した。蛍光標識オリゴDNAプローブは、Bodipy493/503で標識されたオリゴDNA1種類とCy5で標識されたオリゴDNA1種類の2種類1組として実験に使用した。

【0090】(1)F664DプローブとF679AプローブF664Dプローブはc-fosRNAの664塩基-678塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、F679Aプローブはc-fosRNAの679塩基-693塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0091】この2種類1組のプローブをモル比1:1の比率で混合して蛍光スペクトルを測定した。

【0092】さらに、この溶液に、プローブに対してモル比1:1の比率になるようにc-fosRNAを加えて室温で反応させた後、蛍光スペクトルを測定し、スペクトルの変化を観察した(図17)。その結果、c-fosRNAを加えるとBodipy493/503の蛍光強度が減少しCy5の蛍光強度が増大するというスペクトル変化が観察された。同じプローブを使用し、過剰のCos7細胞由来のmRNA(重量比で250倍)を加えたときには、蛍光スペクトルに変化は観察されなかった。さらに、この試料にc-fosRNAをプローブに対して等モル量加えると、蛍光スペクトルに変化があらわれた。したがって、679-693塩基の部位は、本実施例で実験した条件下(室温、生理的塩濃度など)では、溶液中に混在している他の相補的な塩基配列をもつ核酸とハイブリッド体を形成しやすい



構造を水溶液中でとっていることがわかる。

【0093】次に、この 664-693塩基の部位の周辺の構造をさらに詳細に検索するために、塩基配列部位の一部を上流および下流にずらした以下の3組の蛍光標識オリゴDNAプローブを使用した。これらのプローブはいずれもc-fosRNAのそれぞれ特定の30塩基の部位に、2種類のプローブが連続してハイブリダイズすることが可能な塩基配列をもっている。

【0094】(2) F662Dプローブ と F677Aプローブ  
F662Dプローブはc-fosRNAの 662塩基-676塩基の部位に相補的な塩基配列をもち Bodipy493/503で標識されたプローブであり、F677Aプローブはc-fosRNAの 677塩基-691塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0095】(3) F666Dプローブ と F681Aプローブ  
F666Dプローブはc-fosRNAの 666塩基-680塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、F681Aプローブはc-fosRNAの 681塩基-695塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0096】(4) F669Dプローブ と F684Aプローブ  
F669Dプローブはc-fosRNAの 669塩基-683塩基の部位に相補的な塩基配列をもちBodipy493/503で標識されたプローブであり、F684Aプローブはc-fosRNAの 684塩基-698塩基の部位に相補的な塩基配列をもちCy5で標識されたプローブである。

【0097】3組のプローブそれぞれについて、2種類1組のプローブをモル比1:1の比率で混合して蛍光スペクトルを測定した。さらに、この溶液に、プローブに対してモル比1:1の比率になるようにc-fosRNAを加えて室温で反応させた後、蛍光スペクトルを測定し、スペクトルの変化を観察した(図18~20)。その結果、蛍光スペクトルの変化量は(1)および(2)のプローブ組み合わせを使用したときに大きく、これらより2-5塩基ずれた(3)および(4)のプローブ組み合わせを使用したときには小さかった(図21)。

【0098】上記の実験で使用した4組8種類の蛍光標識オリゴDNAプローブについて、それぞれ c-fosRNAとモル比1:1で混合した後、HPLCにより、c-fosRNAと結合したプローブと結合しなかったプローブとを分離した(図22)。保持時間3-4分に遊離のプローブが、保持時間7分に c-fosRNAおよび c-fosRNAとハイブリダイズしたプローブがそれぞれ溶出される。各々のピークの面積比より、各プローブのハイブリッド体の形成率を求めた(図23)。F662Dプローブ、F664Dプローブ、F666Dプローブ、F669Dプローブ、F677Aプローブの5種類はいずれも40%-80%の高い効率でハイブリッド体を形成していたが、F679Aプローブは約20%と比較的低く、F681AプローブとF684Aプローブはほとんどハイブリッド体をつくらなかった。これらの結果

は、(3)のプローブ組み合わせ(F666DプローブとF681Aプローブ)および(4)のプローブ組み合わせ(F669Dプローブ と F684Aプローブ)において蛍光スペクトルがあまり変化しなかった結果とよい相関を示している。

【0099】これらの結果から、本実施例で示したような2種類1組の蛍光標識オリゴDNAプローブと標的RNAの水溶液中での混合物の蛍光スペクトルを測定することによって、その試料の条件下(室温、塩濃度など)における、全長2000塩基のRNAのなかの特定の30塩基の部位のハイブリッド体の形成のしやすさの2-5塩基単位での差を知ることができることがわかる。

【0100】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 16

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

20 配列の種類: cDNA<sub>tom</sub>RNA

配列

NTCTAGTTGG TCTGTC 16

配列番号: 2

配列の長さ: 16

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

30 配列の種類: cDNA<sub>tom</sub>RNA

配列

NCTTCTAGTT GGTCTG 16

配列番号: 3

配列の長さ: 16

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

40 配列の種類: cDNA<sub>tom</sub>RNA

配列

NATCTTCTAG TTGGTC 16

配列番号: 4

40 配列の長さ: 16

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

50 配列の種類: cDNA<sub>tom</sub>RNA

配列

NCTCATCTTC TAGTTG 16

配列番号: 5

配列の長さ: 16

配列の型: 核酸

50 鎖の数: 二本鎖



トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
GCAGACTTCT CNATCT 16  
配列番号：6  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
AAGCAGACTT CNTCAT 16  
配列番号：7  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
CAAAGCAGAC TNTCTC 16  
配列番号：8  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
CTGCAAAGCA GNACTT 16  
配列番号：9  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
NATTATTAAT TCCATT 16  
配列番号：10  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
NGTAAACTT AAATGT 16  
配列番号：11  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列

NGATCCCTTT AGTTCC 16  
配列番号：12  
配列の長さ：15  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
NTAGAAGGCC TGATA 15  
10 配列番号：13  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
NCATTCAACA TAATAA 16  
配列番号：14  
配列の長さ：16  
20 配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
TTTGGGATTC TNTGTA 16  
配列番号：15  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
30 トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
GGCCTTCTTG GNGCAT 16  
配列番号：16  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
40 配列  
ATGAATGTTG TNTTCA 16  
配列番号：17  
配列の長さ：15  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNAatomRNA  
配列  
AATATTTAAA NTAAA 15  
50 配列番号：18

配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 AGATACTATA TNTTAA 16  
 配列番号：19  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 NGCCATTGTA GTTGTA 16  
 配列番号：20  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 NTCCATCTTT GAGCAA 16  
 配列番号：21  
 配列の長さ：17  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 NCATGTCTAA TAAGTAA 17  
 配列番号：22  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 NATACACAAT CGTTTG 16  
 配列番号：23  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 NCTTTGTTGT AATACC 16  
 配列番号：24  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 NCTCATCAAC AACTTC 16  
 配列番号：25  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 10 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 NATCTTGCAA TGCTAG 16  
 配列番号：26  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 20 配列  
 GCTGTTTGTG TNGTAT 16  
 配列番号：27  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 ACTAACGTGT GNGTTC 16  
 30 配列番号：28  
 配列の長さ：17  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列  
 CTGCATCTAC TTNTGTA 17  
 配列番号：29  
 配列の長さ：17  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 40 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA  
 配列TGATTTTCTT TGNAATG 17  
 配列番号：30  
 配列の長さ：16  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：二本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 50 配列の種類：cDNA<sub>tom</sub>RNA

配列

GTTCTTTTCT GNCATC 16

配列番号 : 31

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA<sub>tom</sub>RNA

配列

AACATTCTCC ANTGAA 16

配列番号 : 32

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA<sub>tom</sub>RNA

配列

AGAAGCCTTT TNCAGA 16。

【0101】

【発明の効果】本発明に係る方法は、RNAの高次構造を検出する方法であって、(1)前記RNAと、前記RNAの有する特定の連続する塩基配列A1A2のうちA1とハイブリダイズ可能な塩基配列B1を有するプローブP1と、前記RNAの有する特定の連続する塩基配列A1A2のうちA2とハイブリダイズ可能な塩基配列B2を有するプローブP2とを反応させるステップと、(2)前記RNA上に、前記プローブP1とP2とが連続してハイブリダイズすることにより形成される連続する塩基配列B1B2を検出するステップと、(3)(i)前記連続する塩基配列B1B2が検出される場合は、前記RNAの特定の連続する塩基配列A1A2の高次構造が1本鎖であり、又は(ii)前記連続する塩基配列B1B2が検出されない場合は、前記RNAの特定の連続する塩基配列A1A2の高次構造が2本鎖であると判断するステップからなる方法を提供するものである。

【0102】ここで、本発明においてRNAの高次構造とは、溶液中において、主に、分子内での塩基対の形成に基づく部分的な2本鎖形成（ステム構造ともいう）

と、該塩基対形成のない部分の1本鎖構造、又は環状1本鎖構造（ループ構造という）をいうものとする。係る構造は、溶液の状態（温度、塩濃度等）により特定の平衡状態にありRNA分子の運動とともに変動するものである。本発明に係る方法は、上記の所定の条件下でのRNAの最もありうる高次構造の検出を可能とするものである。さらに、係る所定の条件を変化させた場合に、その変化に従いRNAの高次構造にも変化が生じるが、本発明に係る方法は、係るRNAの高次構造の変化をも検出可能とするものである。

【0103】また、本発明に係る方法により、c-fos mRNA、IL-2 RNA、およびTMV-L RNAの高次構造を検出する

ためのプローブを得ることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は本発明に係る方法により、RNAの高次構造を検出する方法を模式的に表した図である。(a)はハイブリダイズ可能な場合を、また(b)はハイブリダイズ不可能な場合を示す。

【図2】図2は本発明に係る方法により、RNAの高次構造の変化を検出する方法を模式的に表した図である。

【図3】図3は本発明に係る方法により、RNAの高次構造をFRET現象を利用して検出する方法を模式的に表した図である。

【図4】図4は、2種類1組の蛍光標識オリゴDNAプローブ（L183DとL198A）とIL-2RNAをモル比1：1で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

(a)はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。(b)はプローブにIL-2RNAを加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図5】図5は、2種類1組の蛍光標識オリゴDNAプローブ（L228DとL243A）とIL-2RNAをモル比1：1で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

(a)はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。(b)はプローブにIL-2RNAを加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図6】図6は、2種類1組の蛍光標識オリゴDNAプローブ（L389DとL404A）とIL-2RNAをモル比1：1で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

(a)はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。(b)はプローブにIL-2RNAを加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図7】図7は、2種類1組の蛍光標識オリゴDNAプローブ（L536DとL550A）とIL-2RNAをモル比1：1で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

(a)はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。(b)はプローブにIL-2RNAを加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図8】図8は、2種類1組の蛍光標識オリゴDNAプローブ（L715DとL730A）とIL-2RNAをモル比1：1で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

(a)はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。(b)はプローブにIL-2RNAを加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図9】図9は、蛍光標識オリゴDNAプローブとIL-2RNAをモル比1：1で混合した試料を高速液体クロマトグラフ（HPLC）で分離したときのHPLCのチャートを示す図である。上段のチャートは蛍光強度で検出したときの溶出パターンを、下段のチャートは紫外吸収値（260nm）で検出したときの溶出パターンを示す。

【図10】図10は、2種類1組の蛍光標識オリゴDNAプローブ（T62DとT76A）とTMV-L RNAをモル比



1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。RNA(-) はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。RNA(+) はプローブに TMV-LR NA を加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図 1 1】図 1 1 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (T2514D と T2529A) と TMV-LR NA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。RNA(-) はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。RNA(+) はプローブに TMV-LR NA を加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図 1 2】図 1 2 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (T3380D と T3396A) と TMV-LR NA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。RNA(-) はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。RNA(+) はプローブに TMV-LR NA を加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図 1 3】図 1 3 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (T4038D と T4053A) と TMV-LR NA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。RNA(-) はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。RNA(+) はプローブに TMV-LR NA を加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図 1 4】図 1 4 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (T5281D と T5296A) と TMV-LR NA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。RNA(-) はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。RNA(+) はプローブに TMV-LR NA を加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図 1 5】図 1 5 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (T5479D と T5494A) と TMV-LR NA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。RNA(-) はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。RNA(+) はプローブに TMV-LR NA を加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図 1 6】図 1 6 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (T1926D と T1941A) と TMV-LR NA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。RNA(-) はプローブのみのときの蛍光スペクトルをあらわす。RNA(+) はプローブに TMV-LR NA を加えた後の蛍光スペクトルをあらわす。

【図 1 7】図 1 7 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (F664D と F679A) と c-fos RNA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

【図 1 8】図 1 8 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (F662D と F677A) と c-fos RNA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

10 【図 1 9】図 1 9 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (F666D と F681A) と c-fos RNA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

【図 2 0】図 2 0 は、2 種類 1 組の蛍光標識オリゴ DNA プローブ (F669D と F684A) と c-fos RNA をモル比 1 : 1 で混合したときの蛍光スペクトルを示す図である。

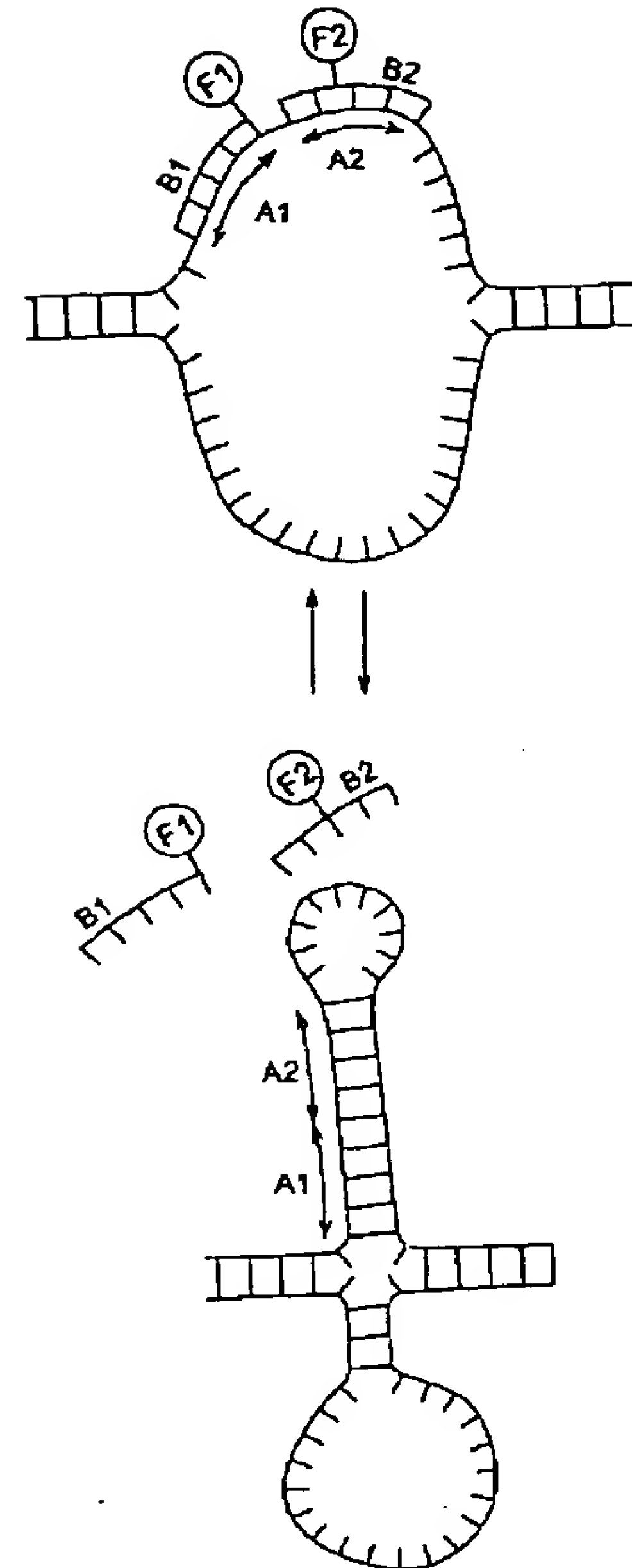
20 【図 2 1】図 2 1 は、図 1 7 ~ 図 2 0 の蛍光スペクトルにおける、515 nm の蛍光強度 ( $I_{515}$ ) と 670 nm の蛍光強度 ( $I_{670}$ ) との比率 ( $I_{670} / I_{515}$ ) を、それぞれのスペクトルについてプロットしたものである。プローブの組み合わせはそれぞれ、F664D/F679A は図 1 7 のスペクトル、F662D/F677A は図 1 8 のスペクトル、F666D/F681A は図 1 9 のスペクトル、F669D/F684A は図 2 0 のスペクトル、である。また、「c-fos RNA」は、プローブのみの蛍光スペクトルの値である。

30 【図 2 2】図 2 2 は、蛍光標識オリゴ DNA プローブと c-fos RNA をモル比 1 : 1 で混合した試料を高速液体クロマトグラフ (HPLC) で分離したときの HPLC のチャートを示す図である。蛍光強度で検出したときの溶出パターンを示す。

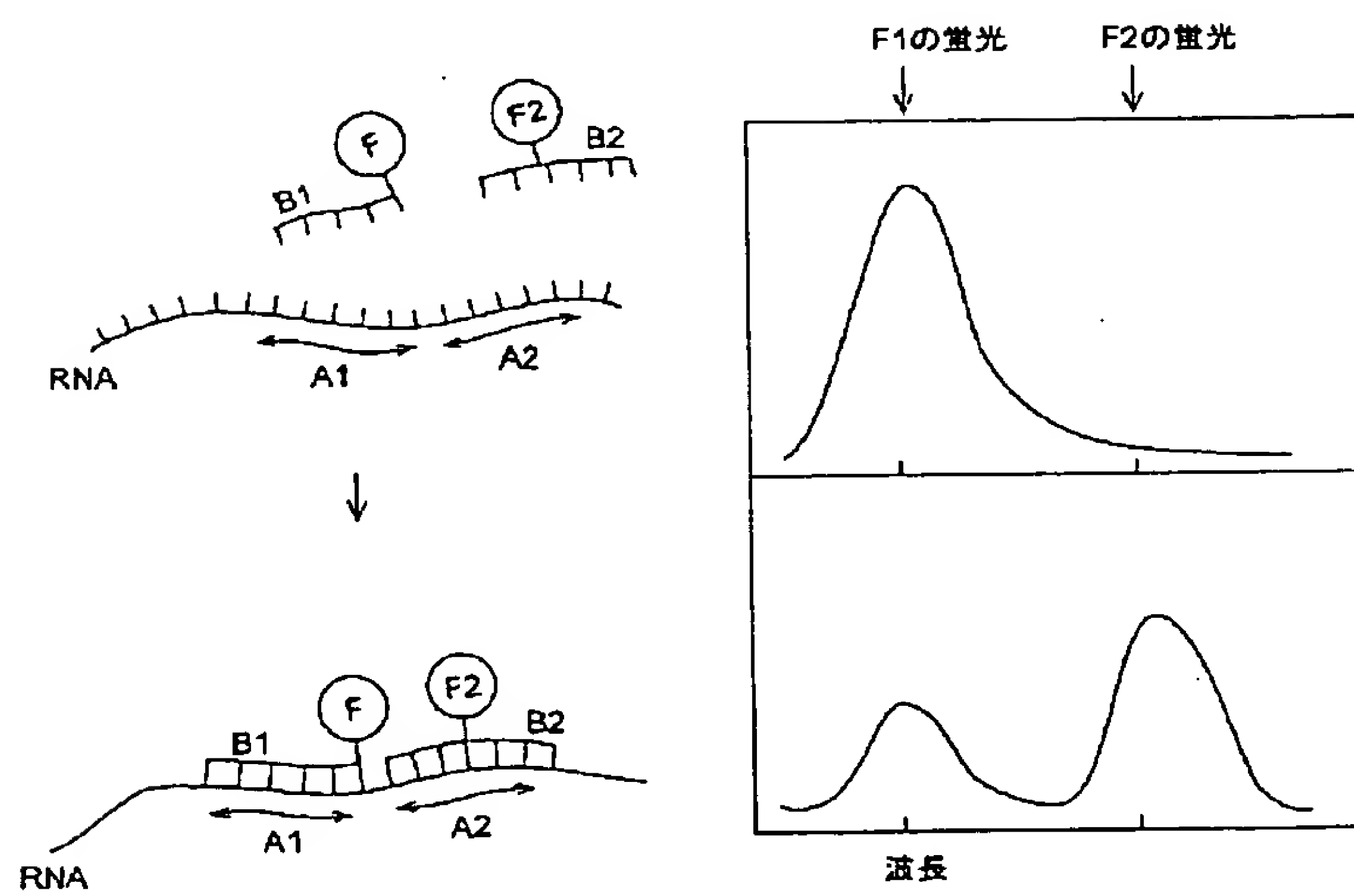
【図 2 3】図 2 3 は、図 1 9 の HPLC のチャートの解析結果を示した図である。各プローブそれぞれについて、c-fos RNA と結合した成分の比率を示している。HPLC チャートの 2 つの成分 (溶出の早いピーク → 遊離のプローブ、遅いピーク → c-fos RNA と結合したプローブ) の比率を面積比より求めた。

40 【図 2 4】図 2 4 は、本発明において意味する RNA の高次構造を模式的に示す図であり、1 本鎖構造、ループ構造、又は 2 本鎖構造を示す。

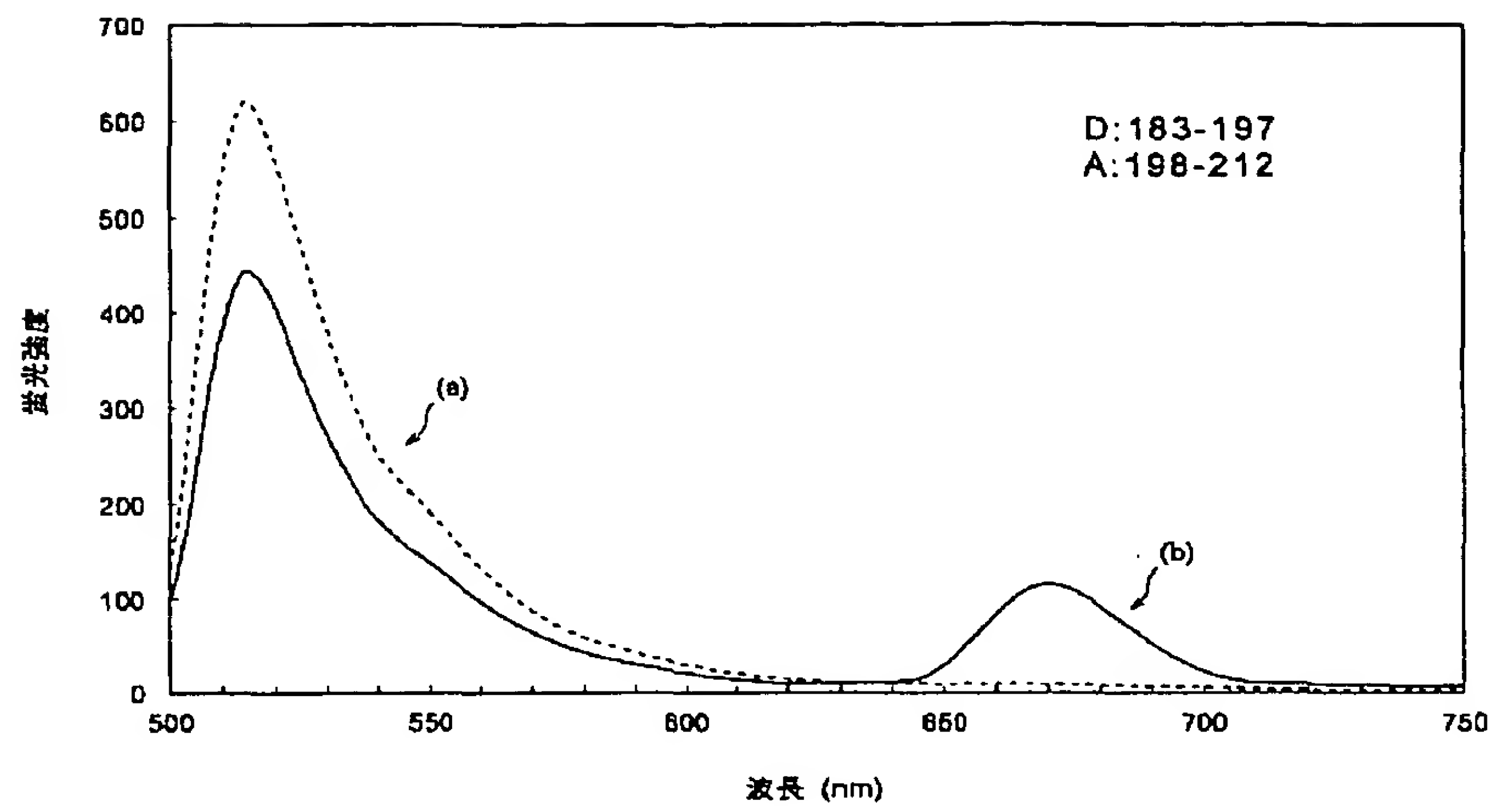
【圖 2】



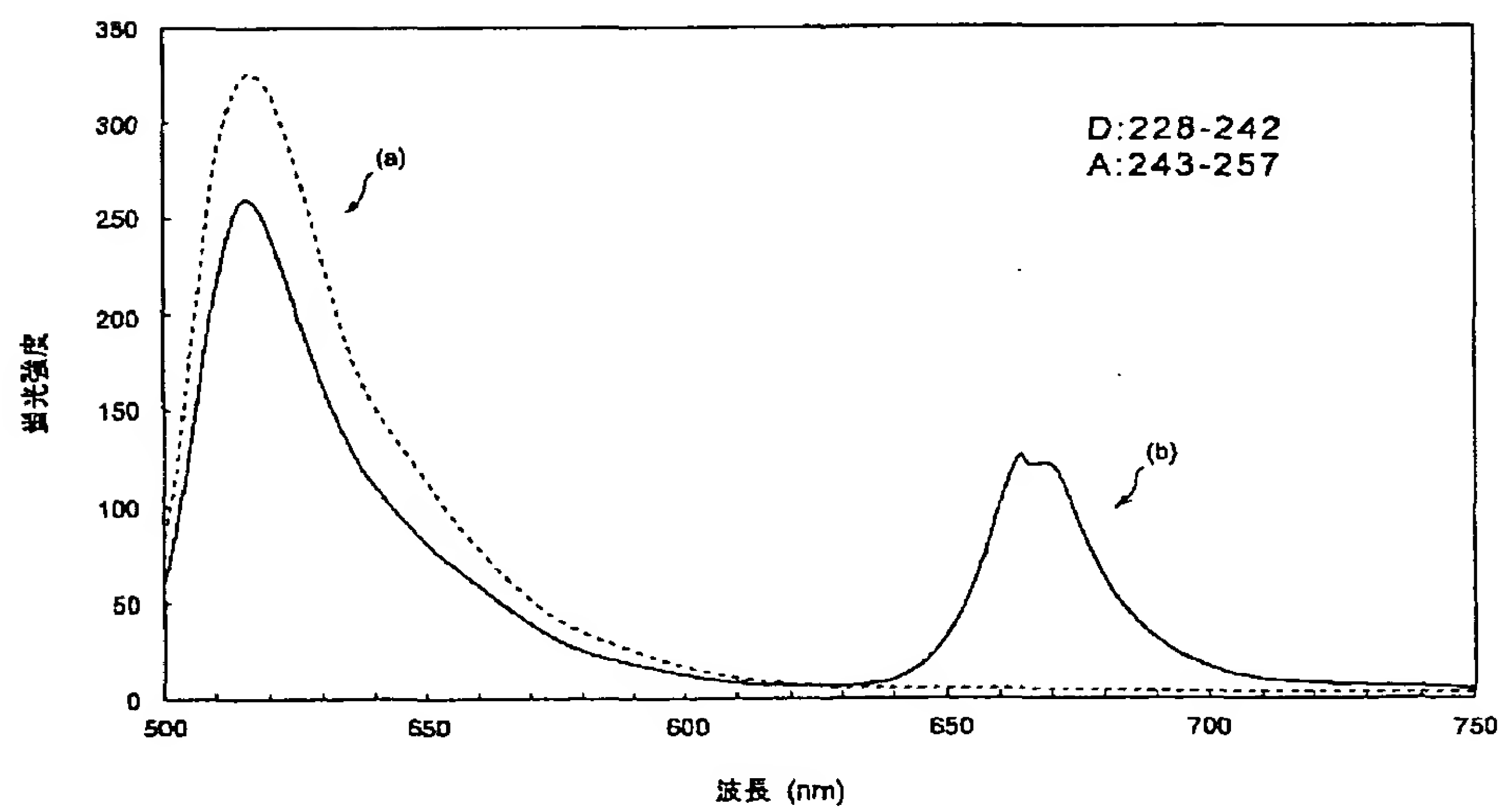
【図 3】



【図 4】

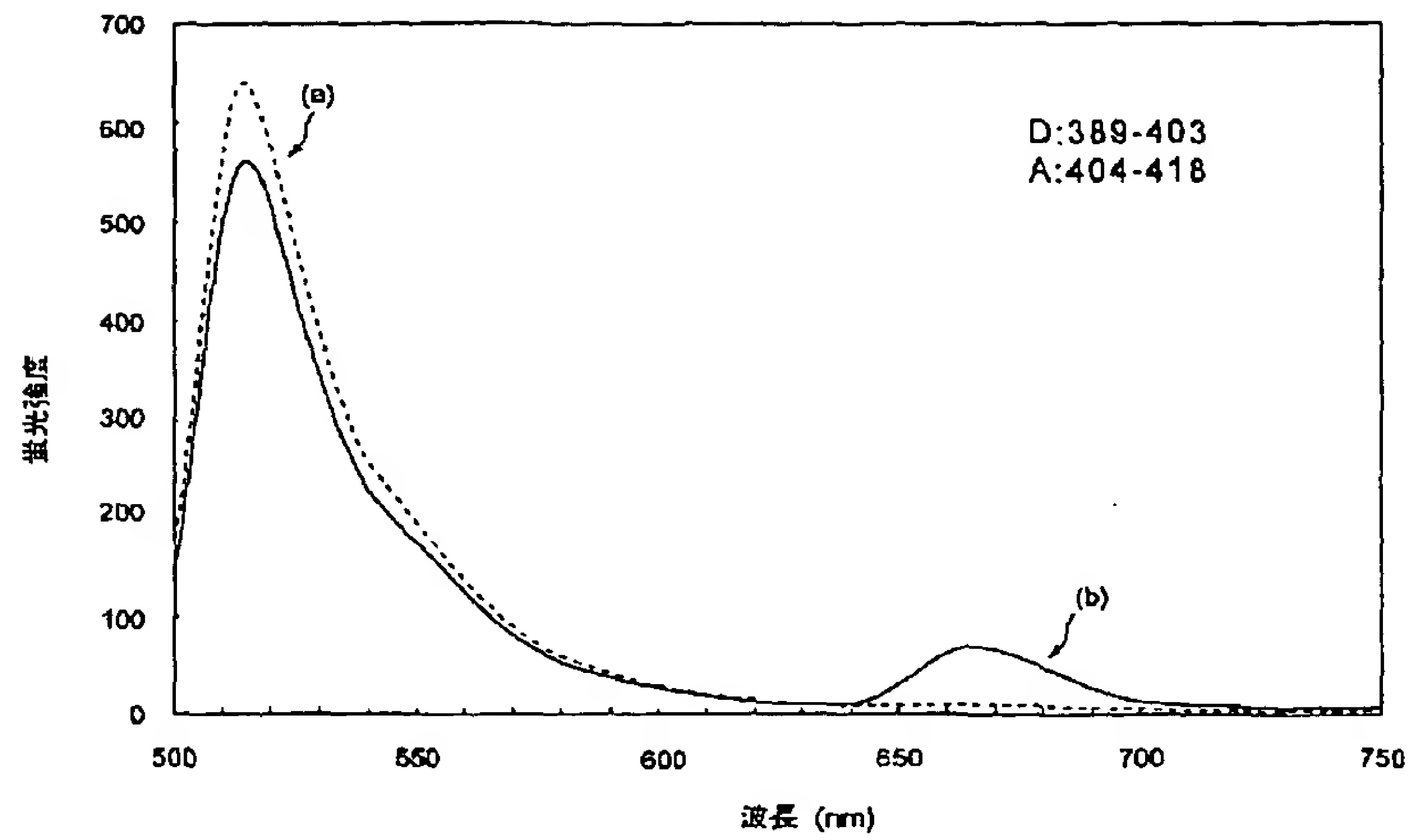


【図 5】

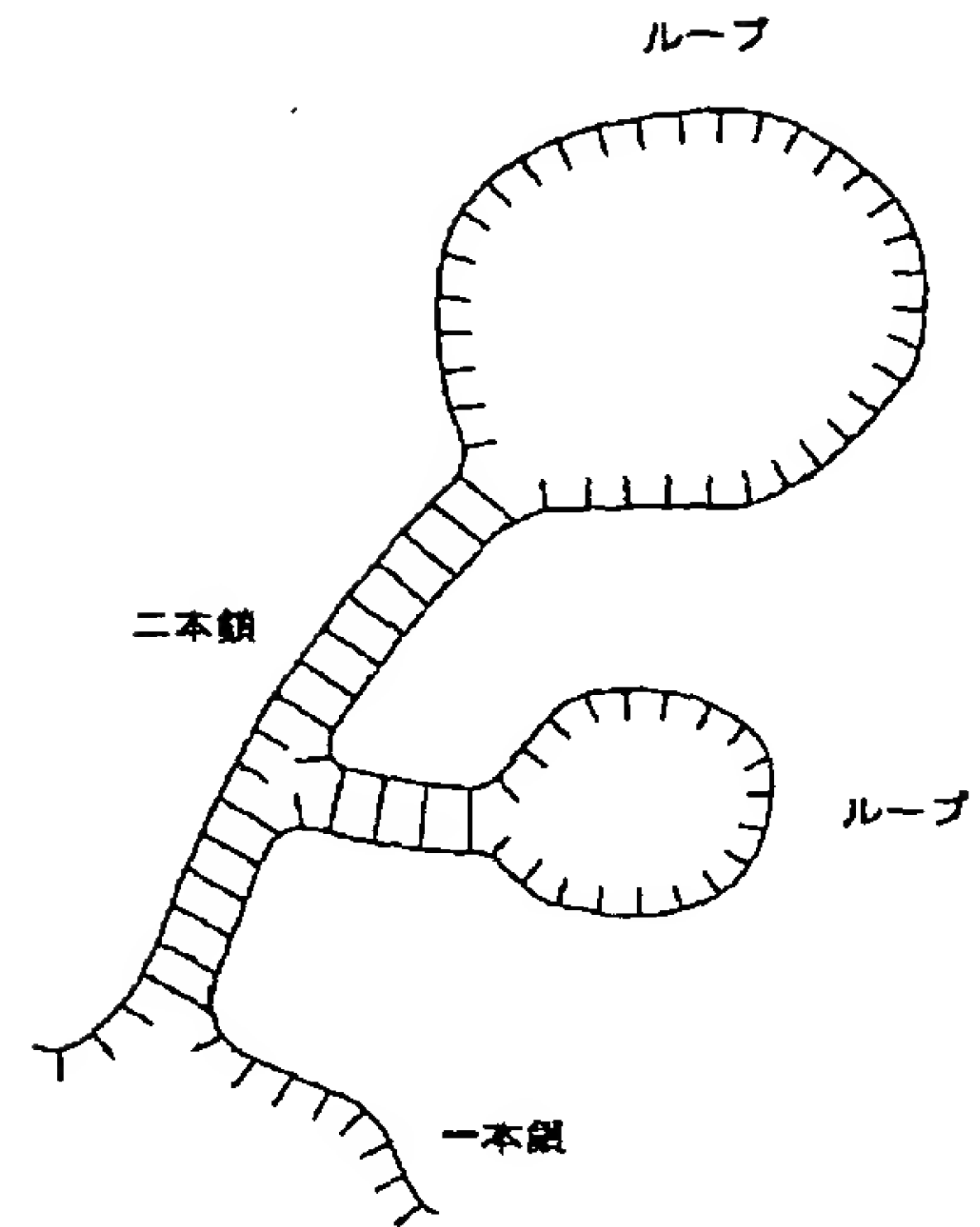




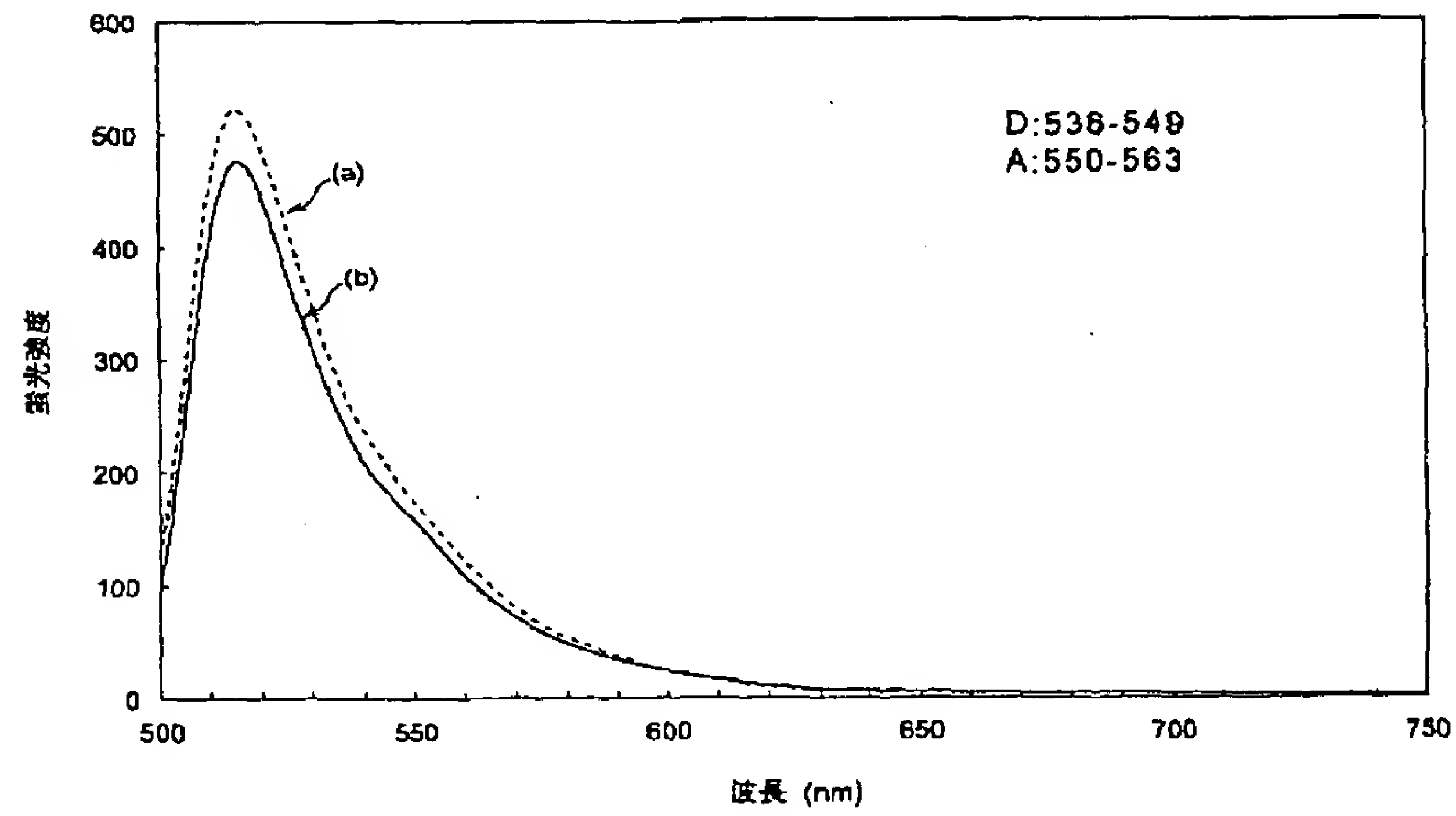
【図6】



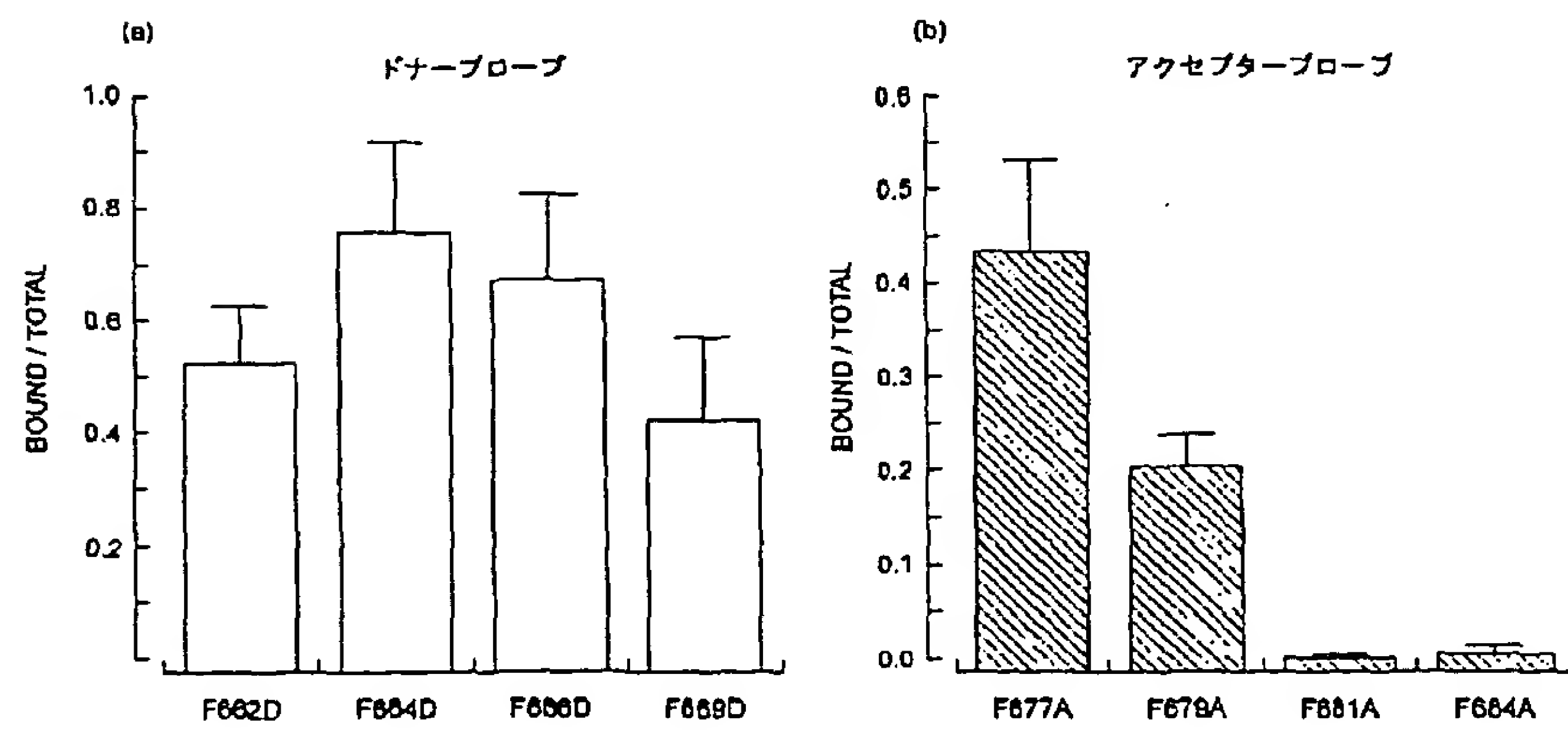
【図24】



【図7】

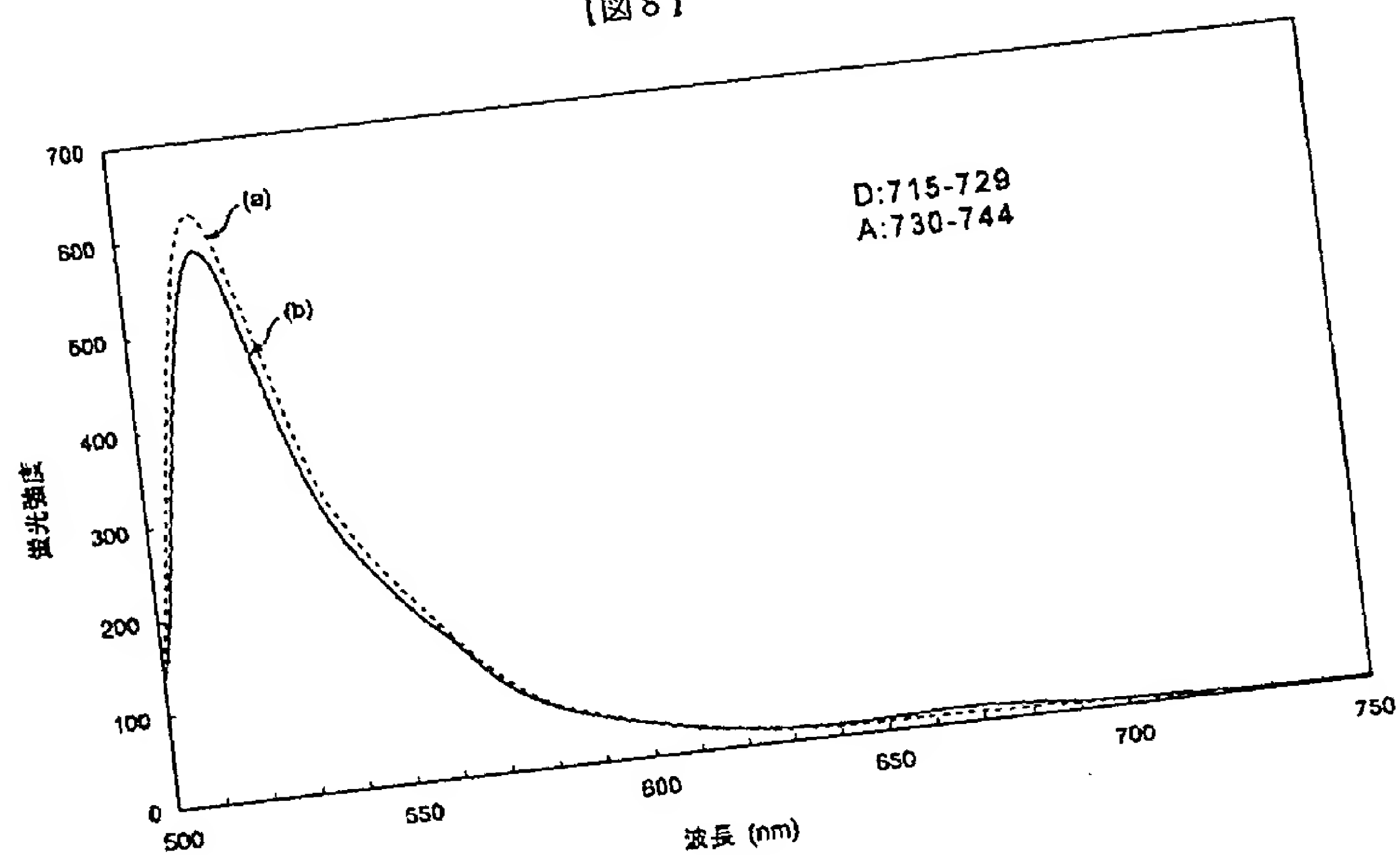


【図23】

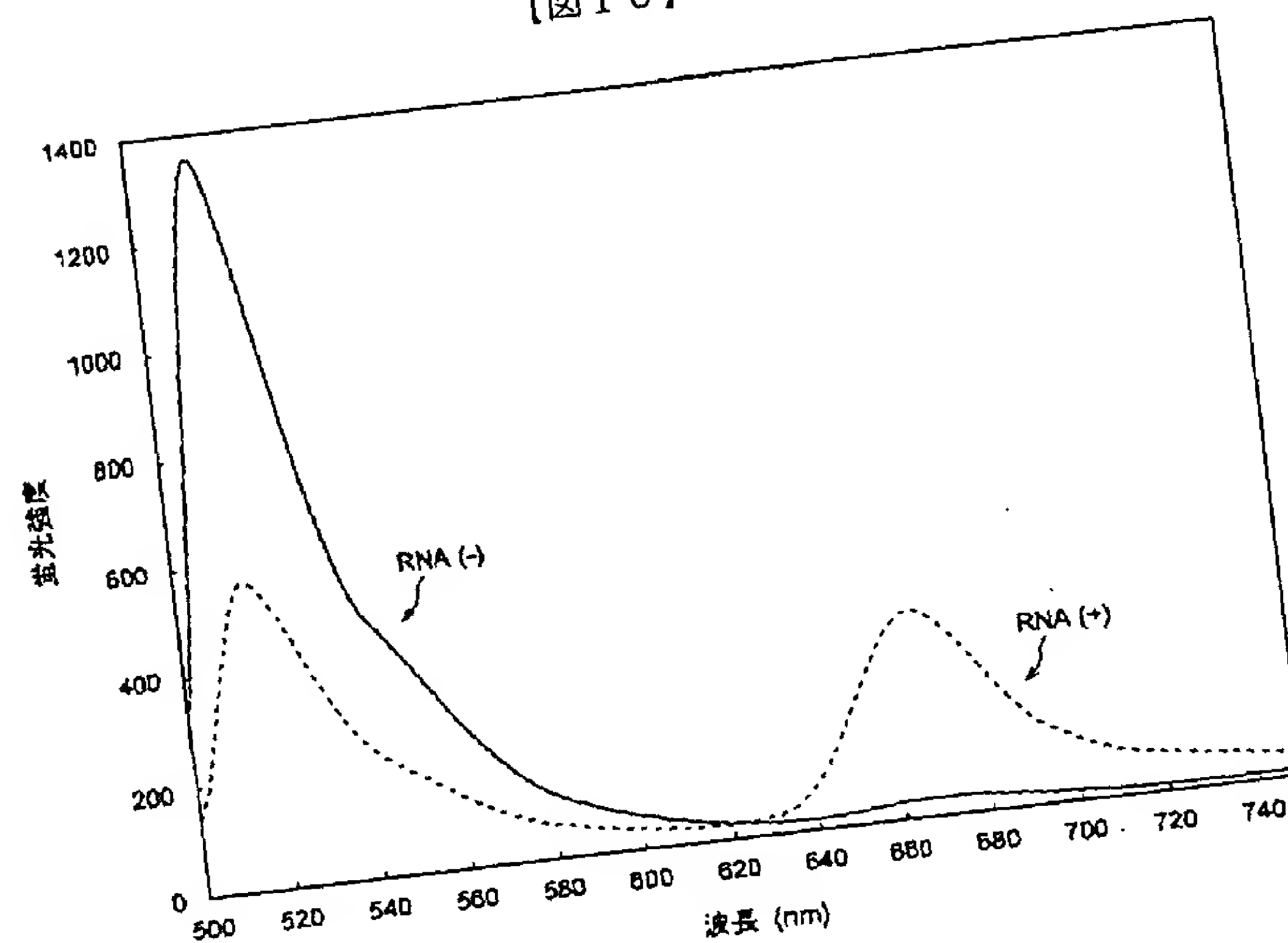


(20)

【図8】



【図10】



プローブの  
種類

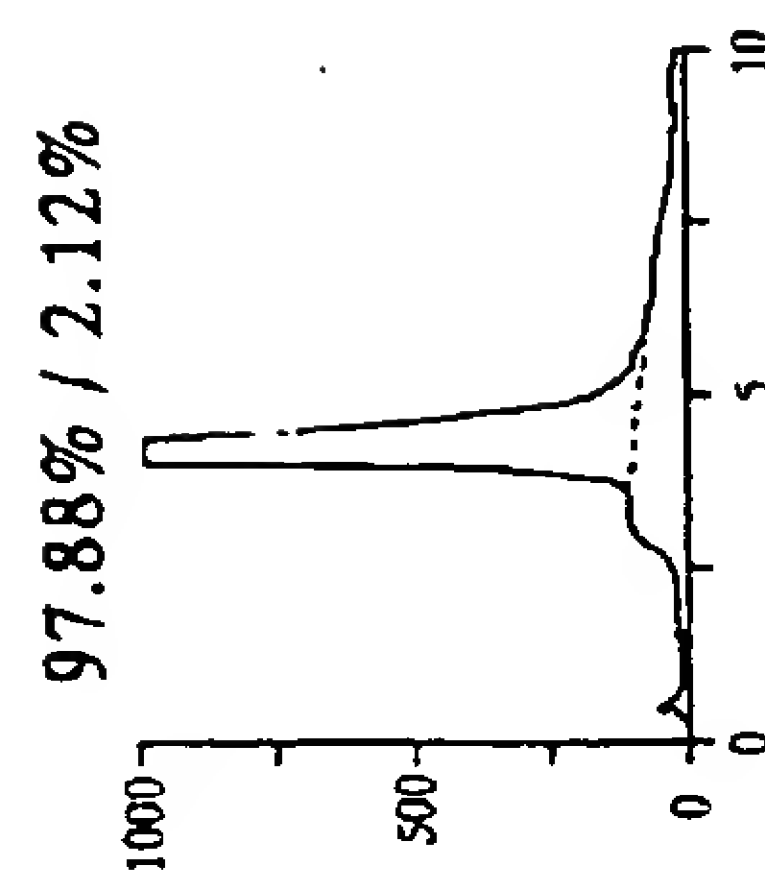
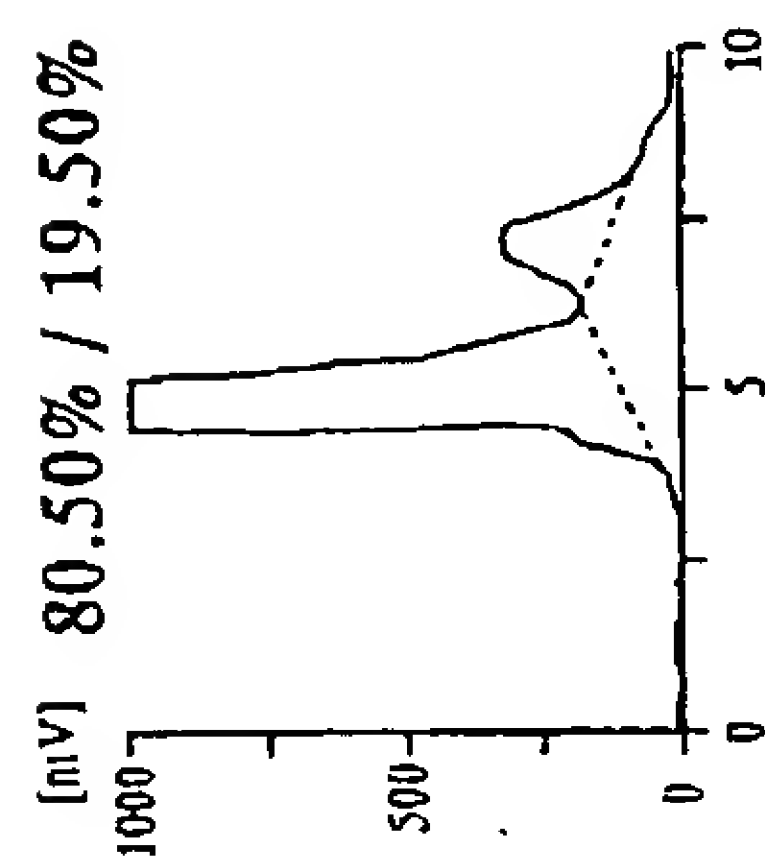
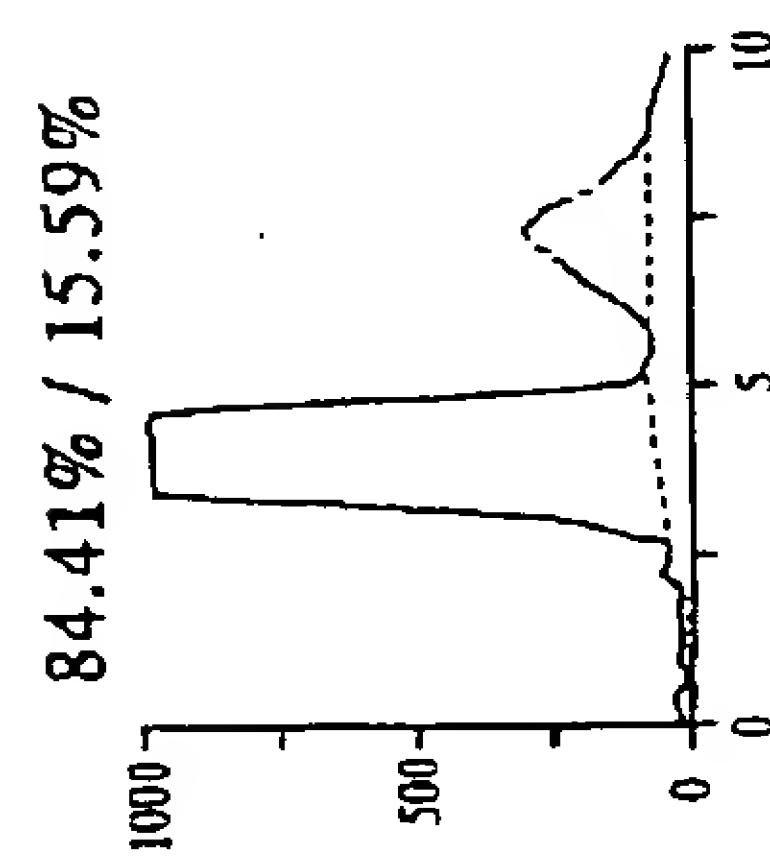
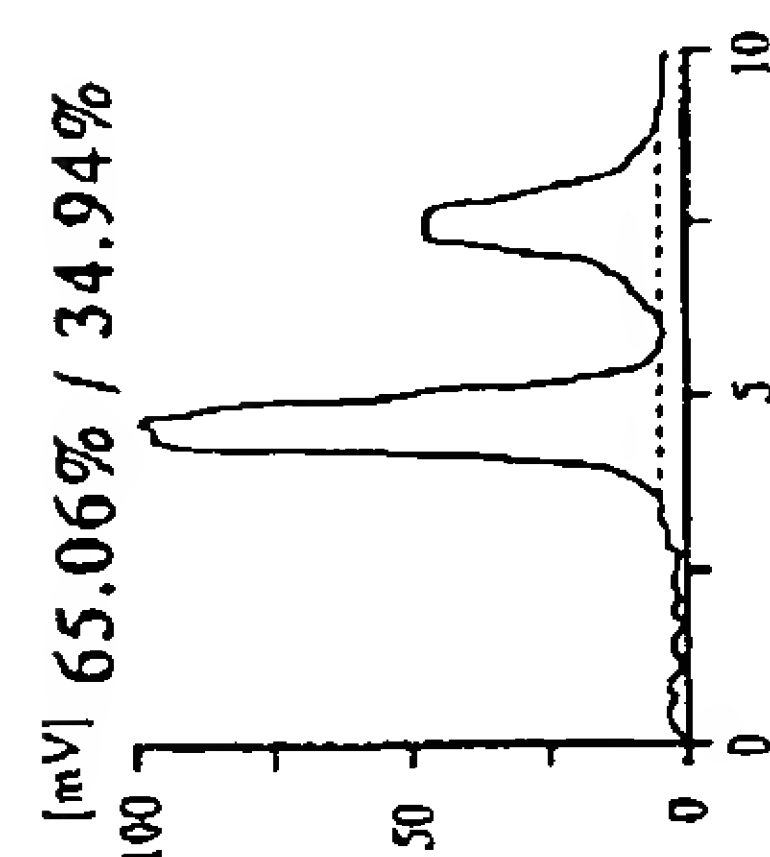
(a)L228D

(b)L243D

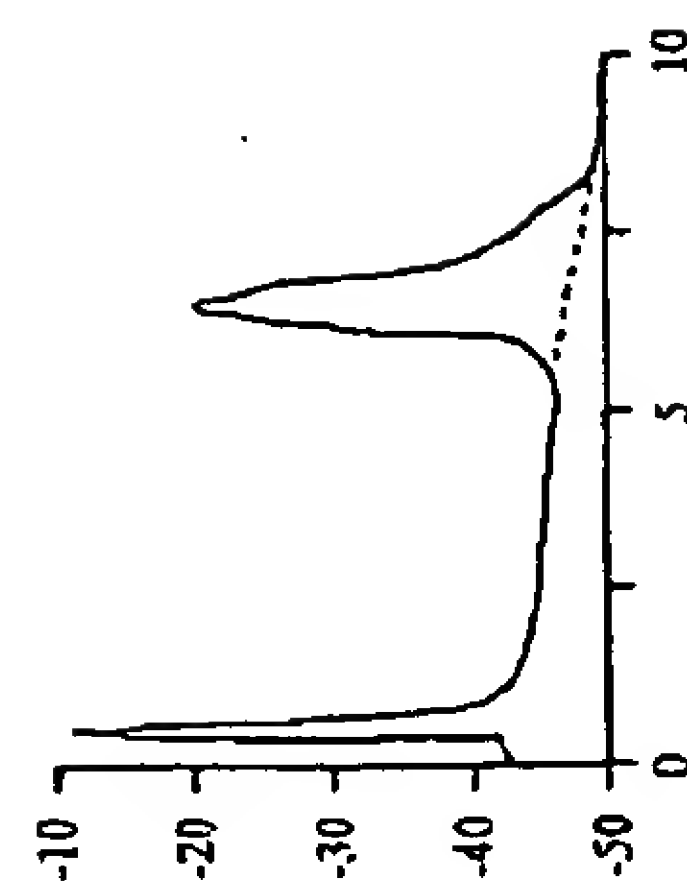
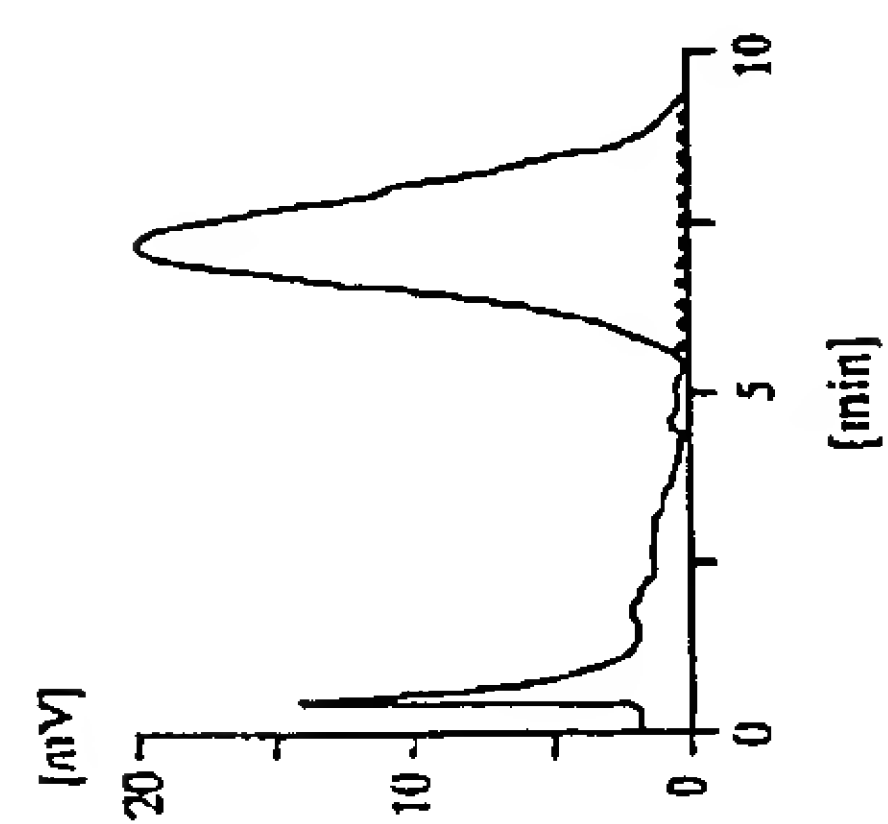
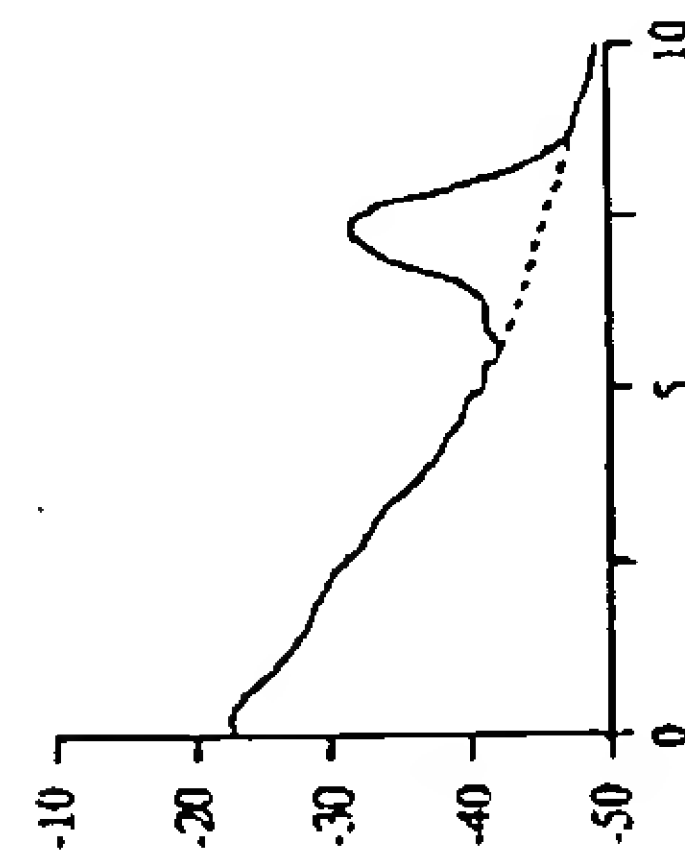
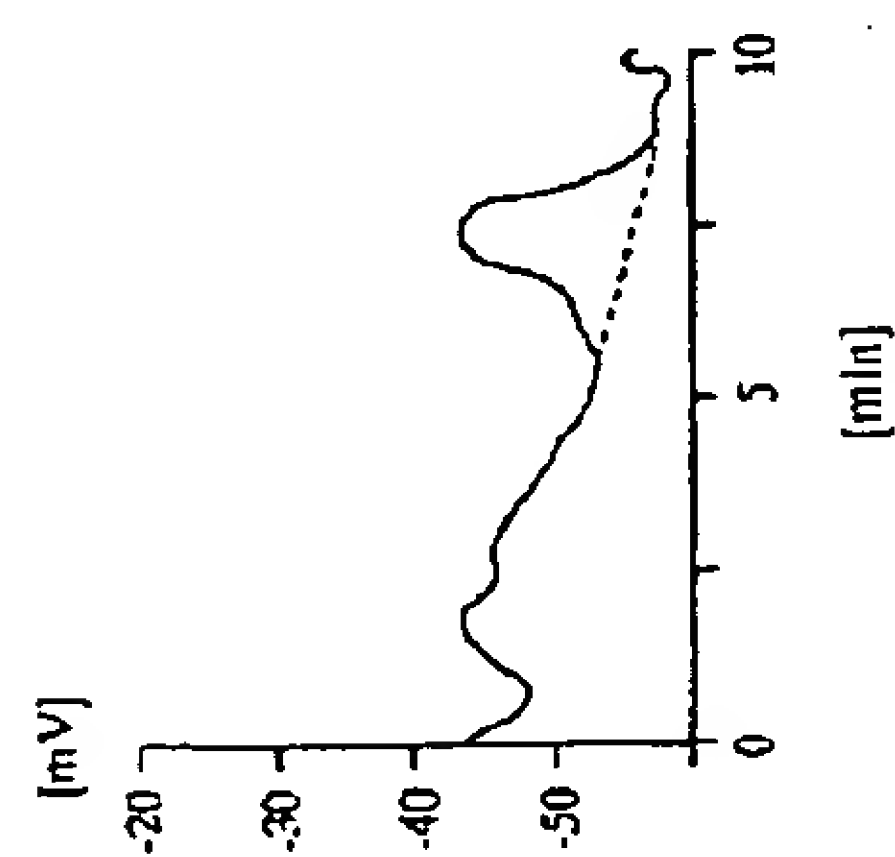
(c)L715D

(d)L730A

Channel 1 (蛍光検出)

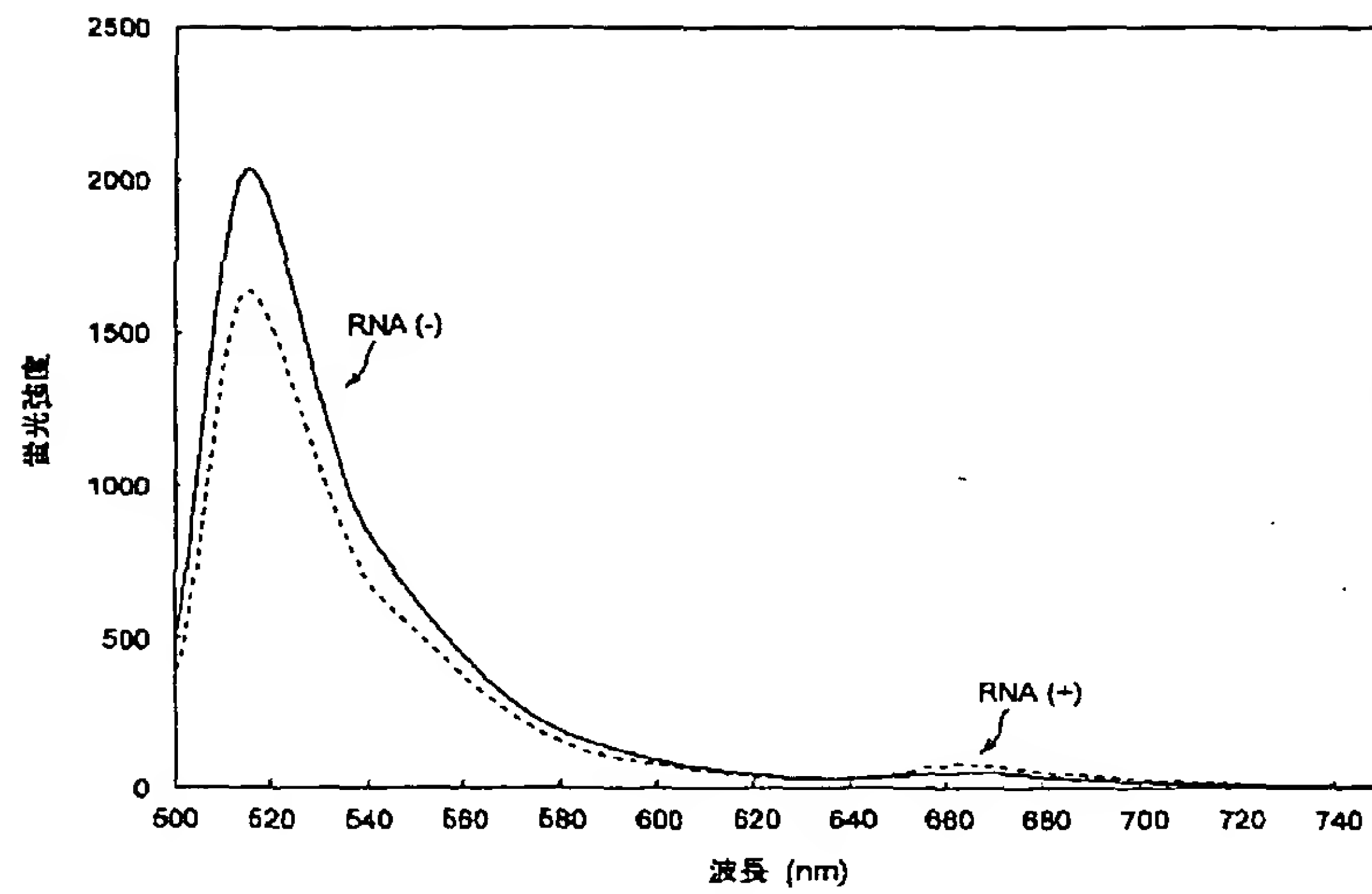


Channel 2 (核種検出)

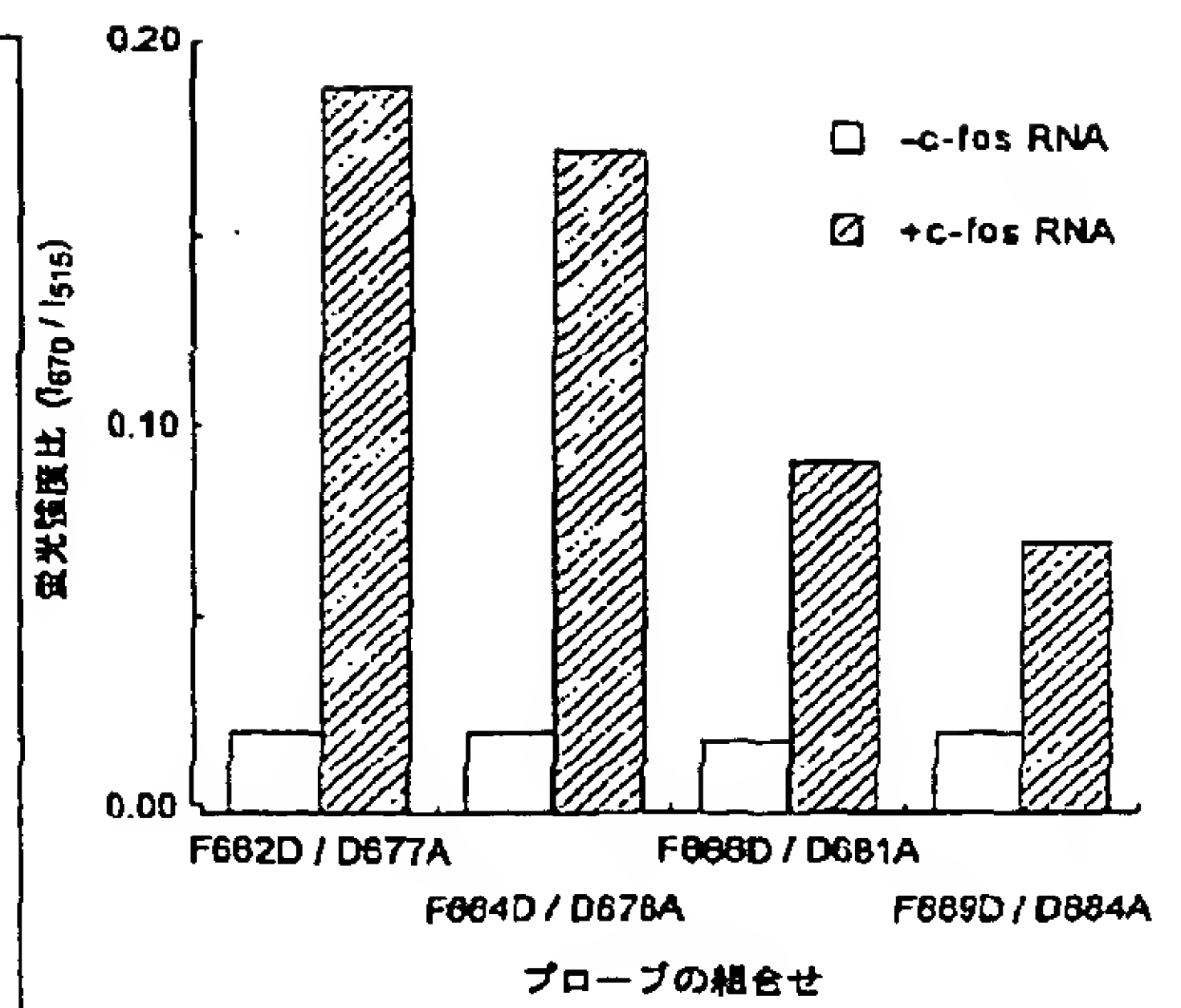


【図 9】

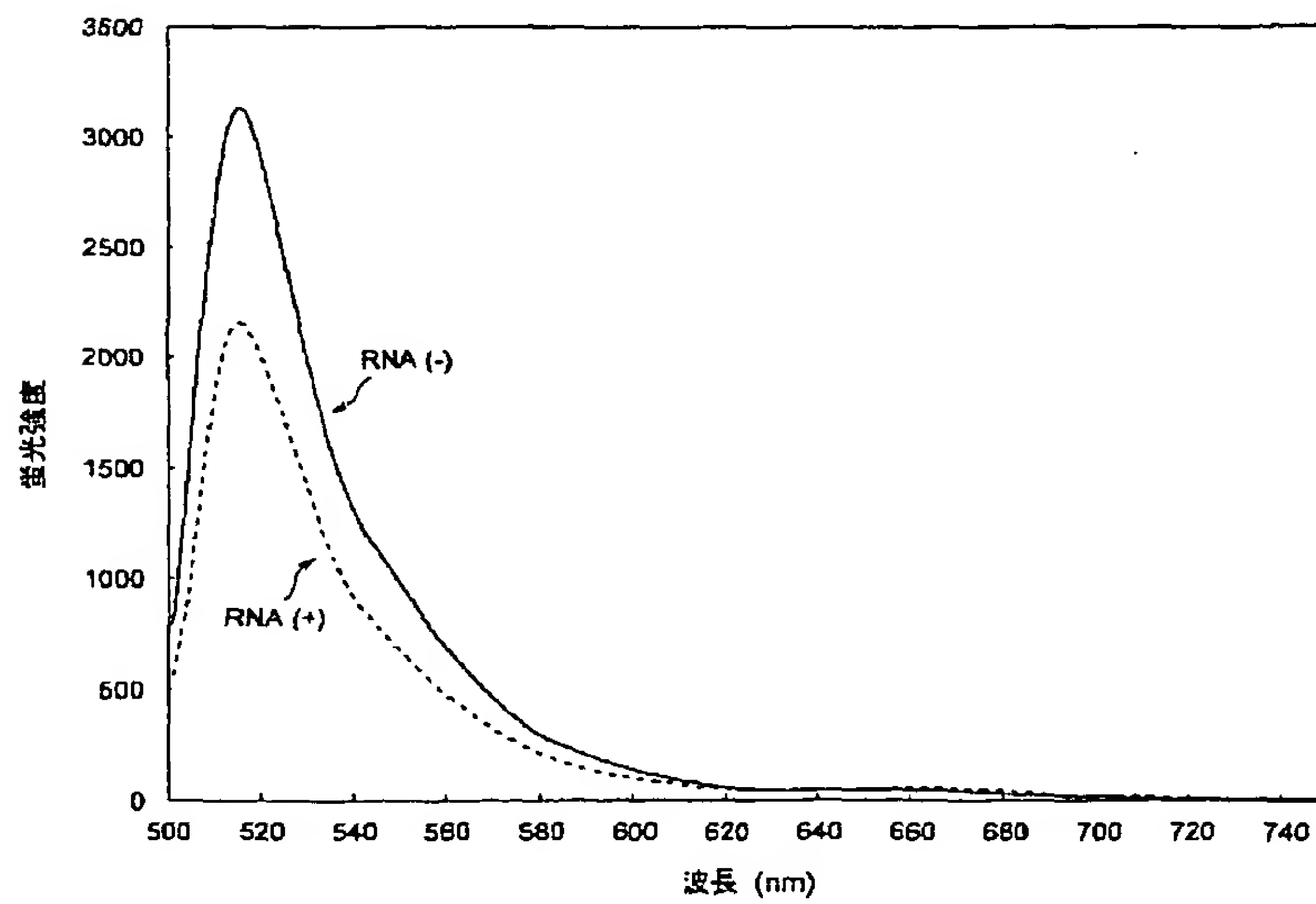
【図 1 1】



【図 2 1】

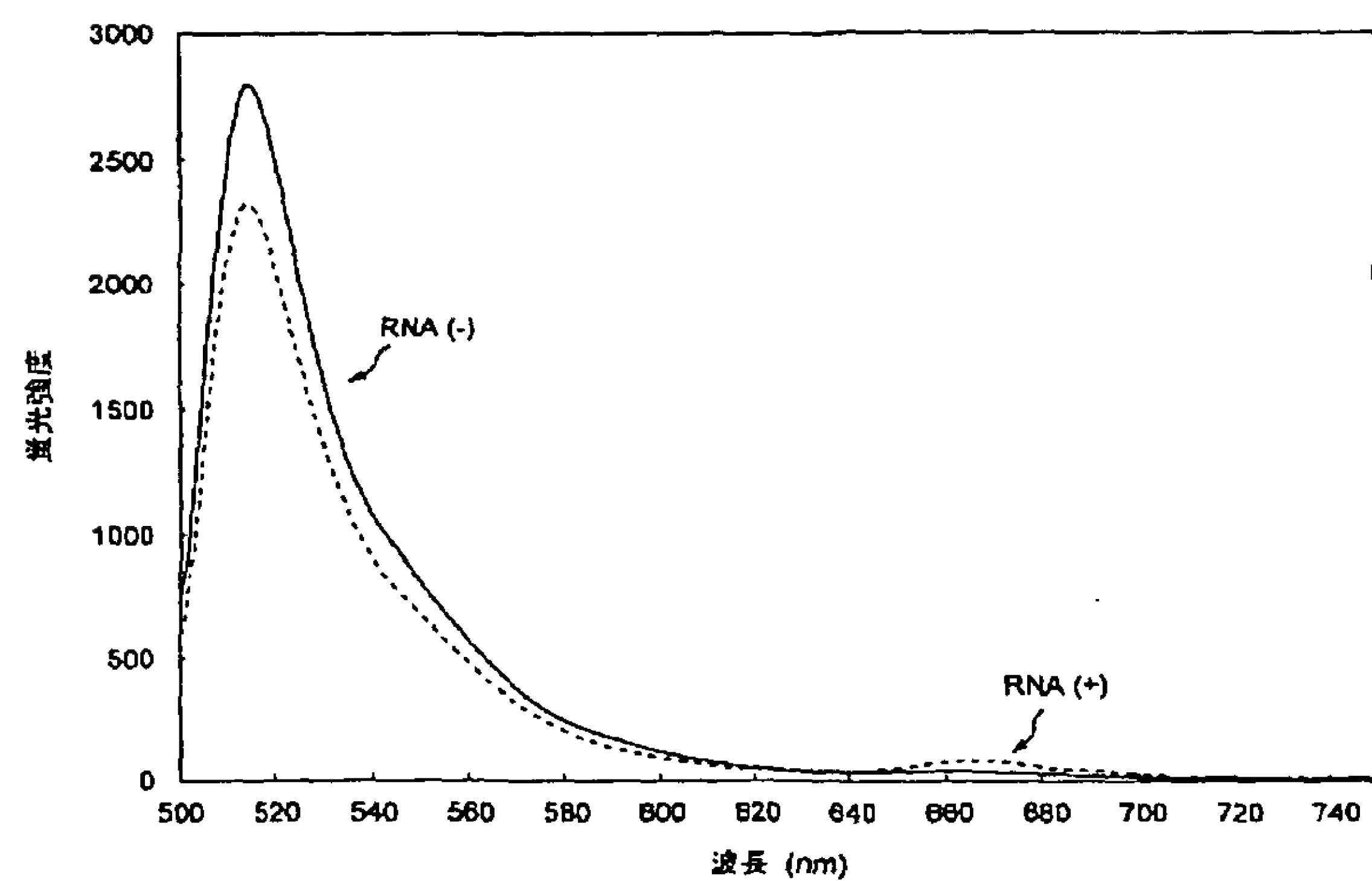


【図 1 2】

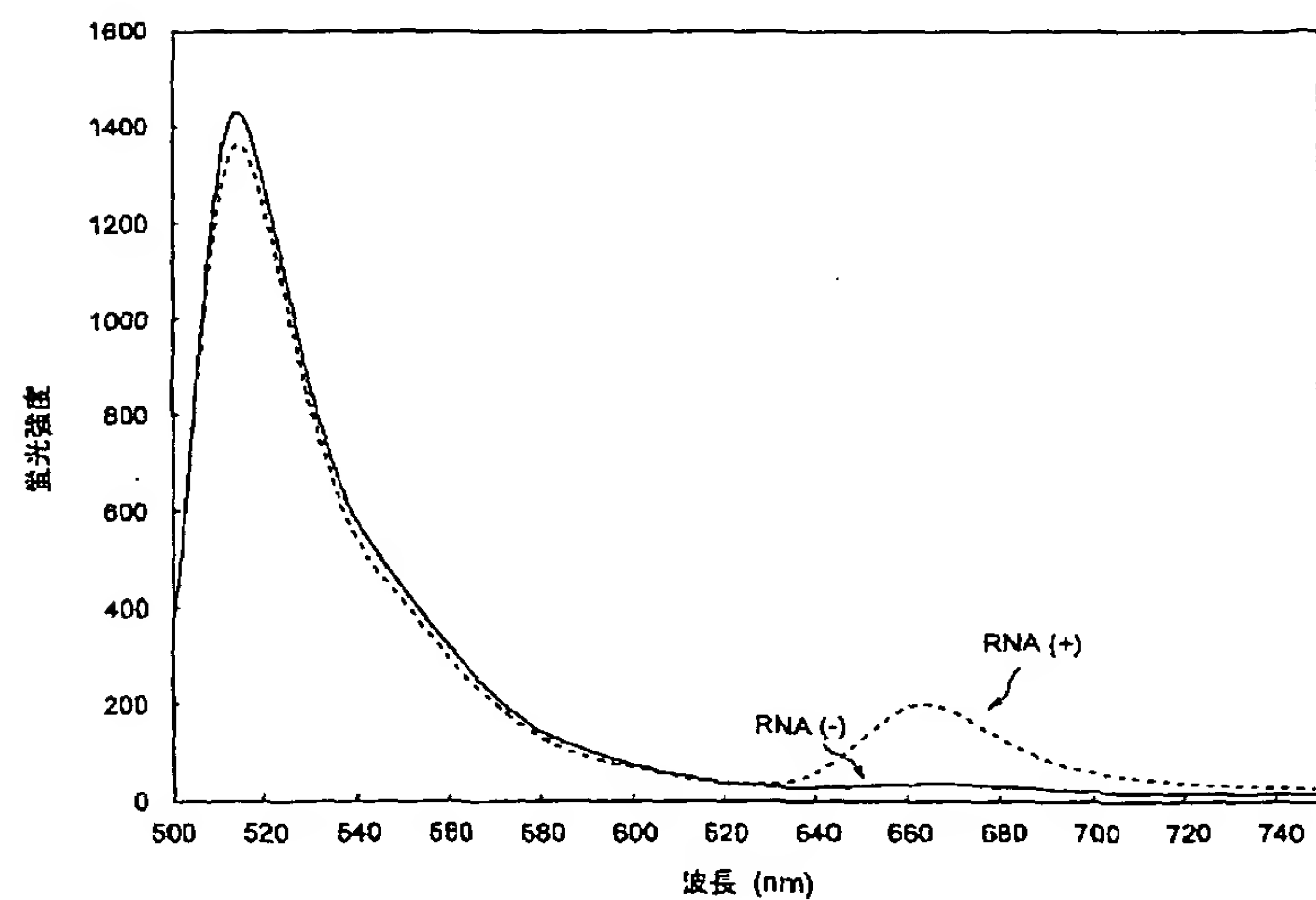




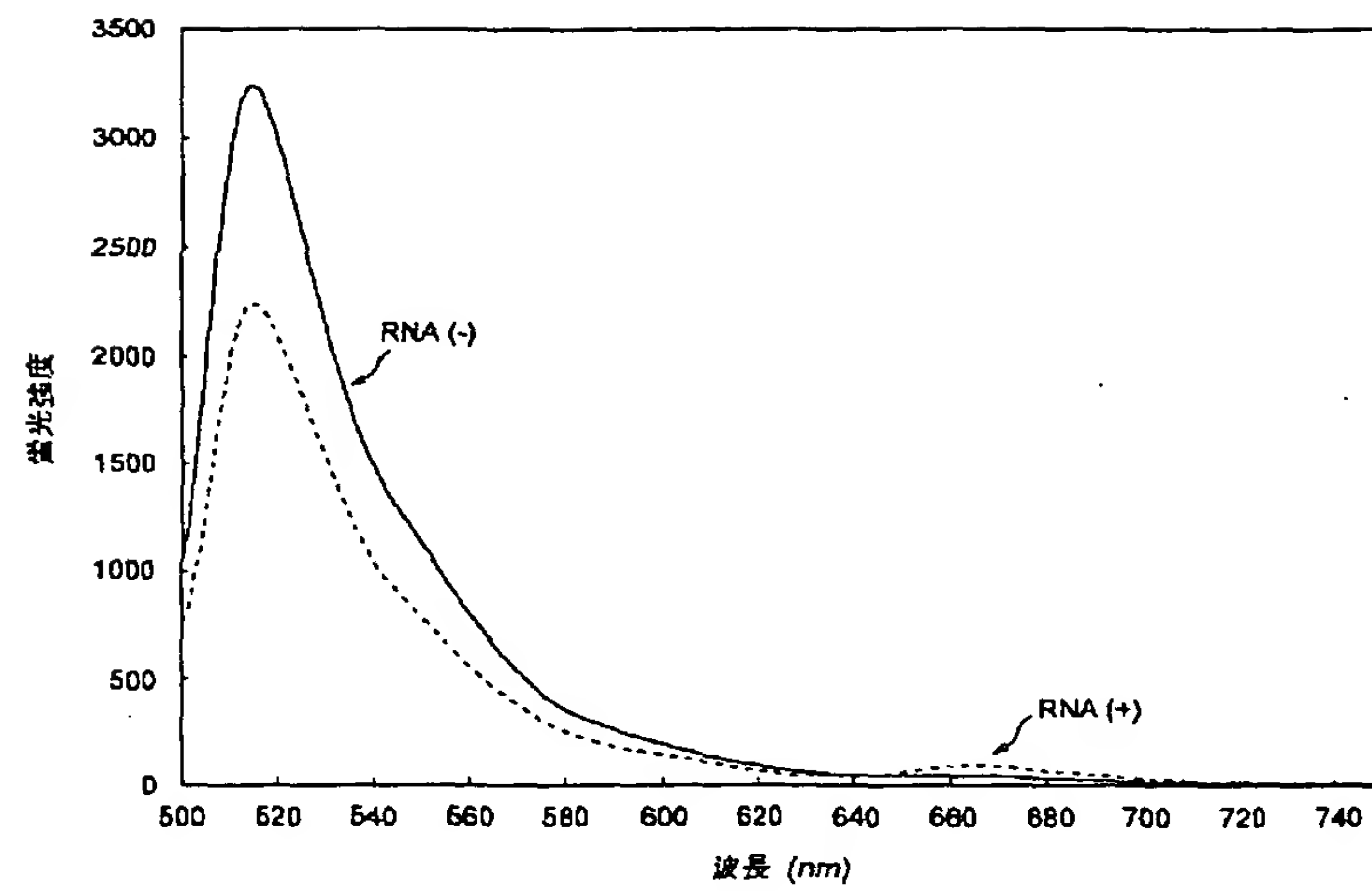
【図 1 3】



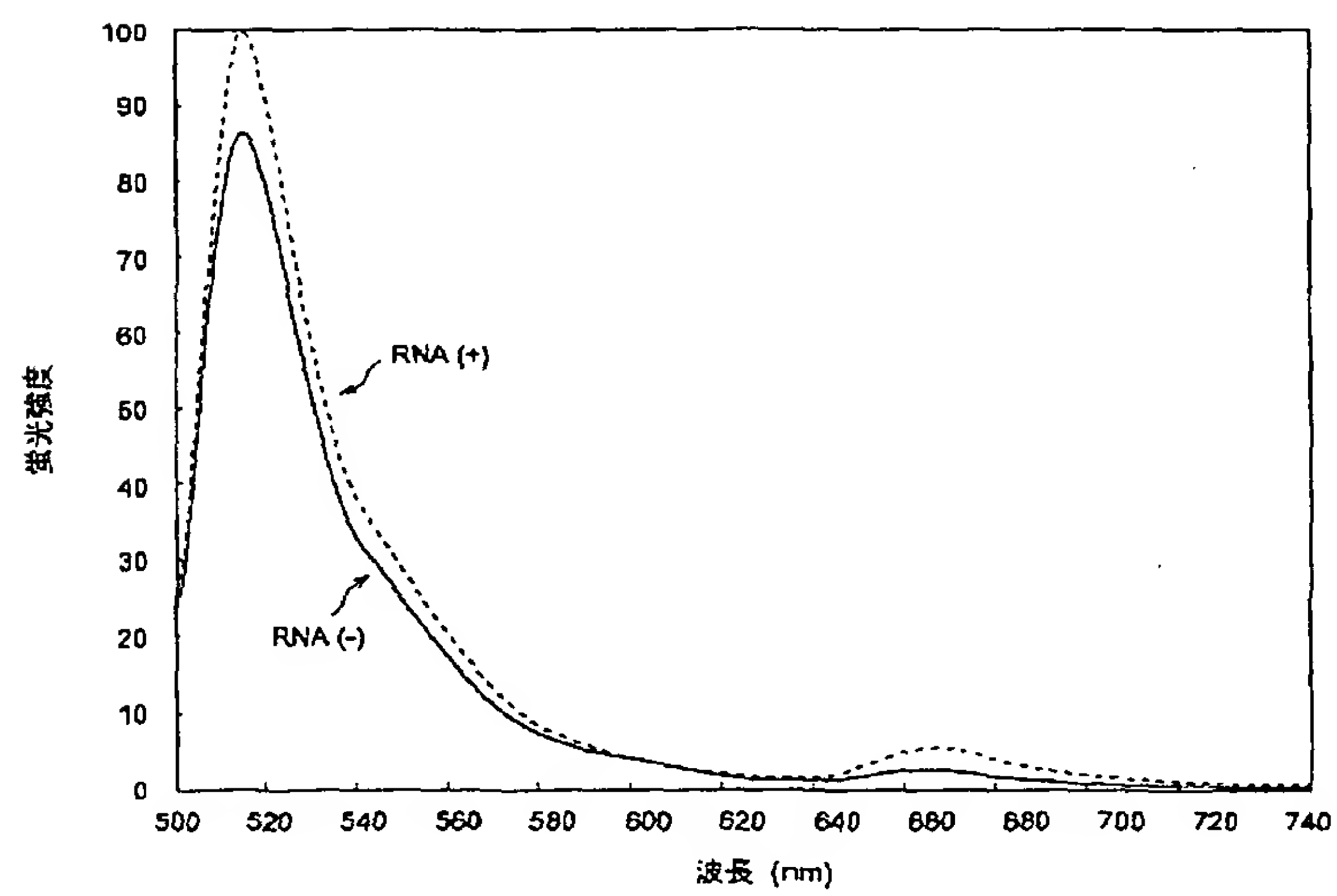
【図 1 4】



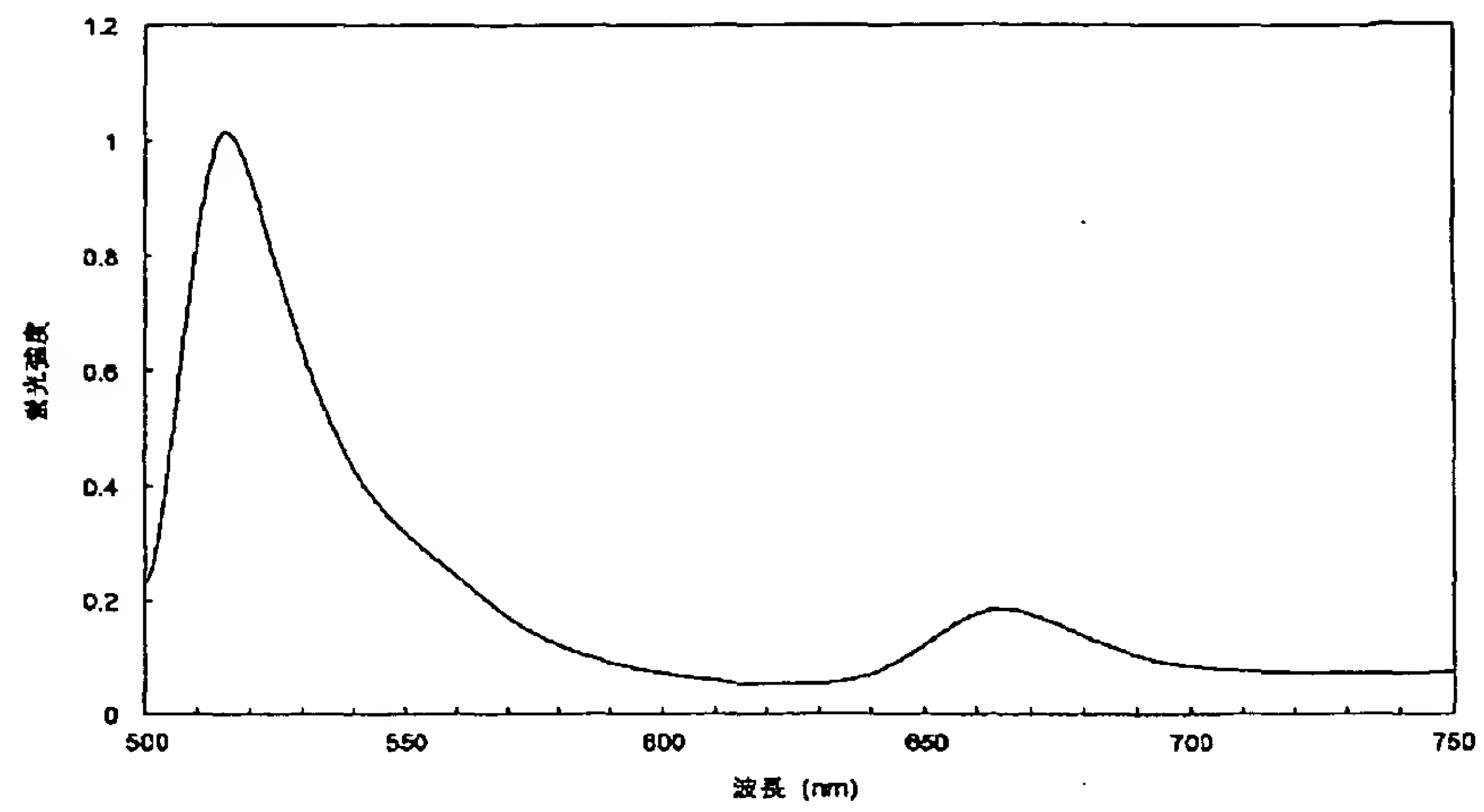
【図 1 5】



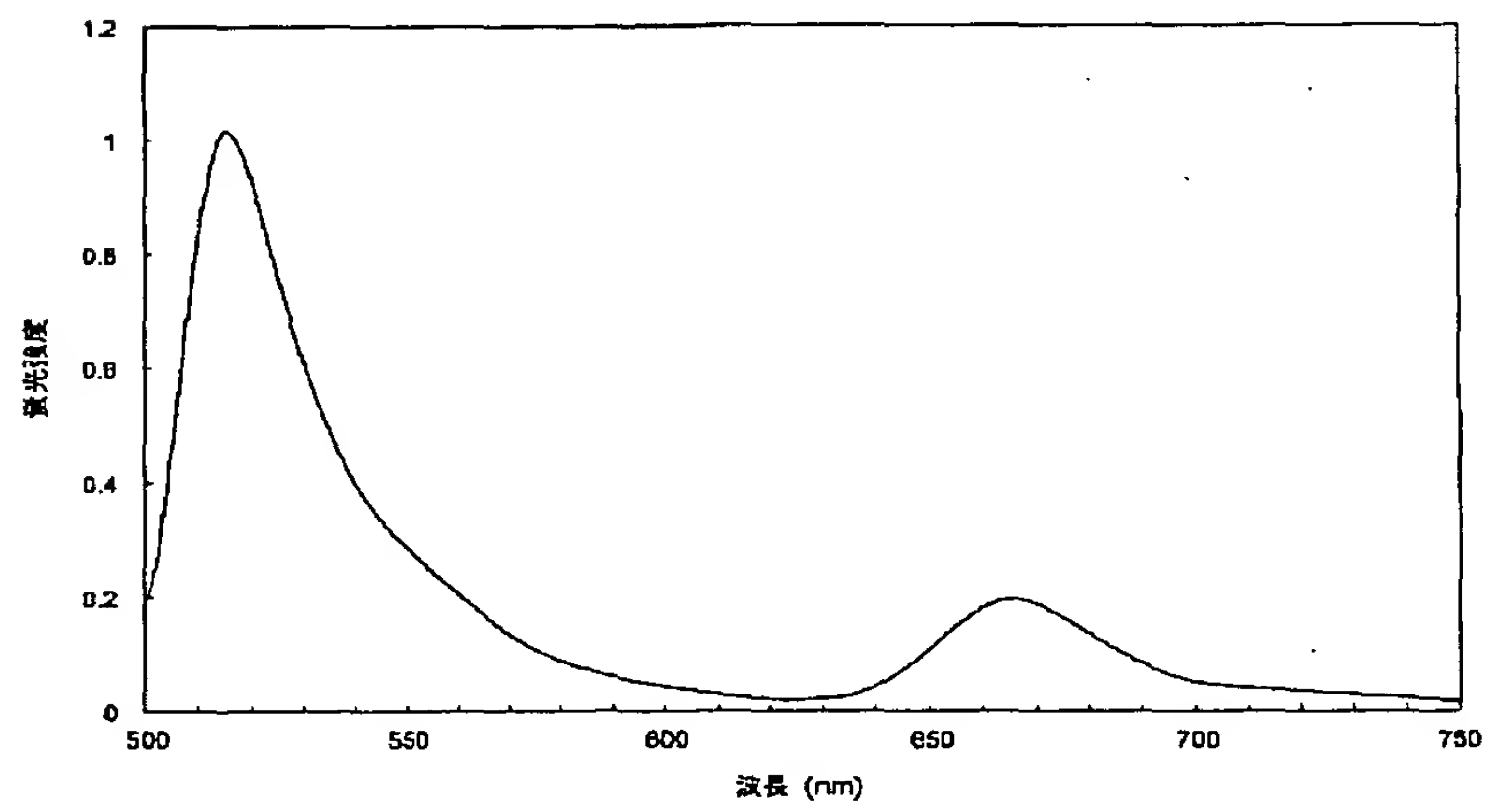
【図 1 6】



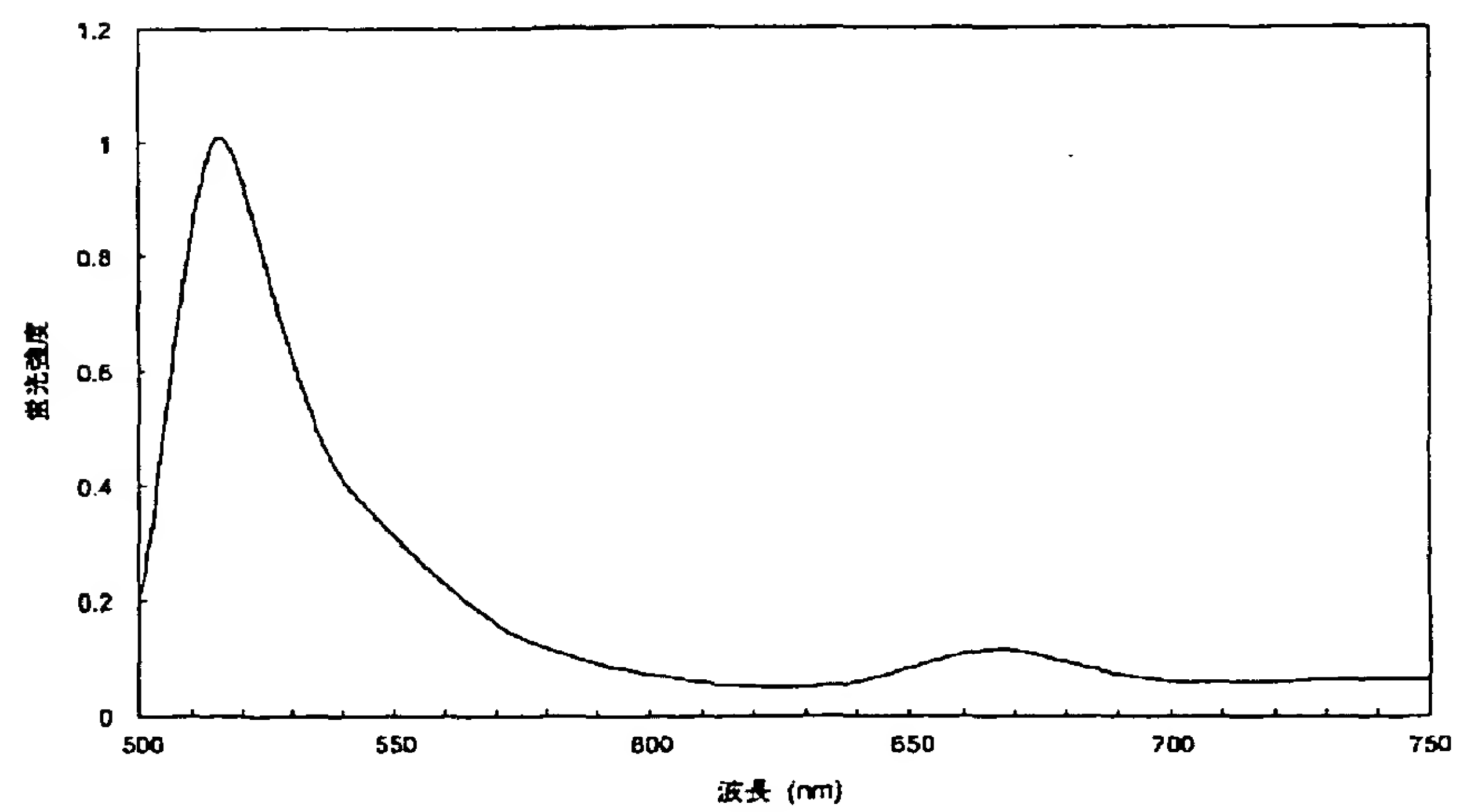
【図 1 7】



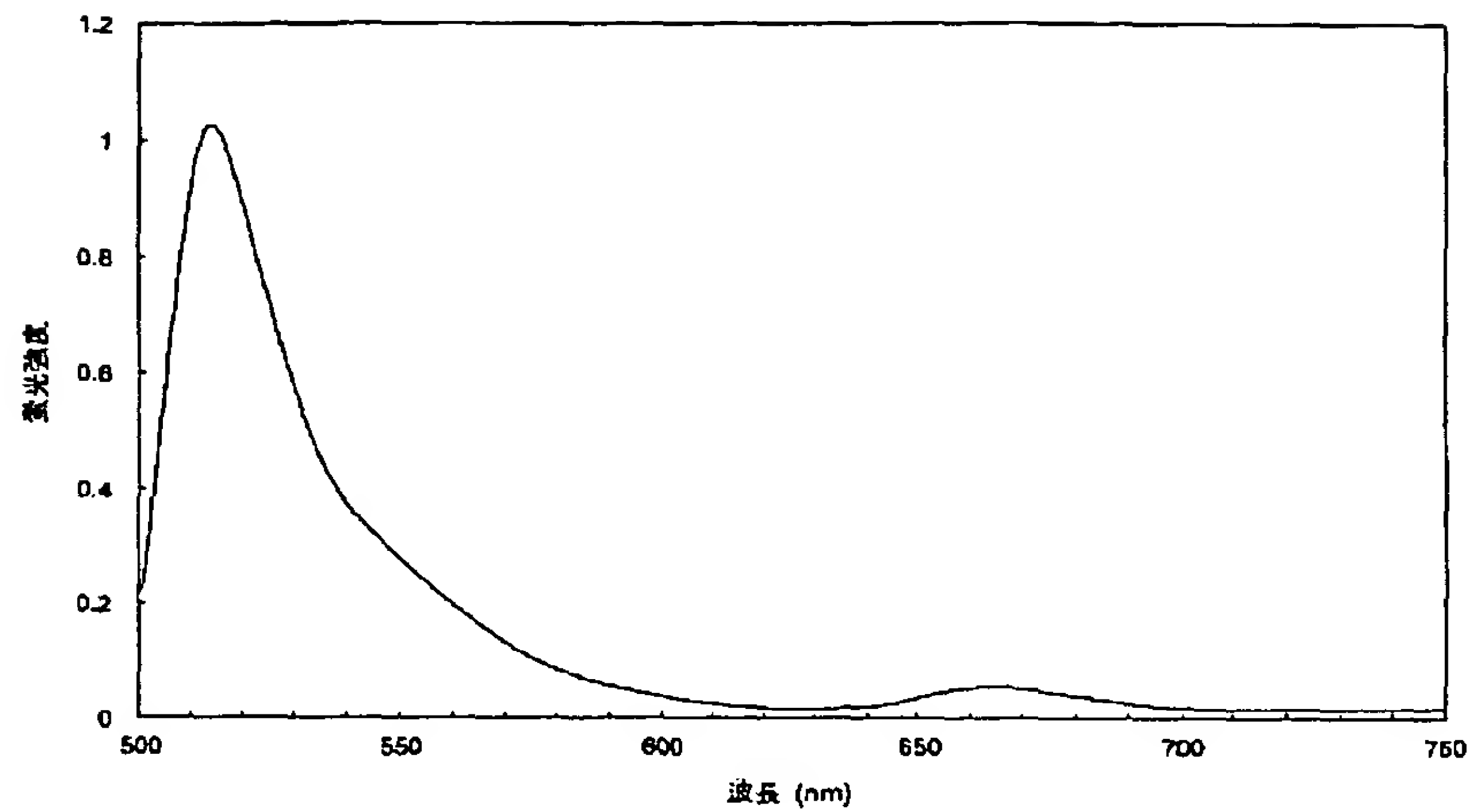
【図 1 8】



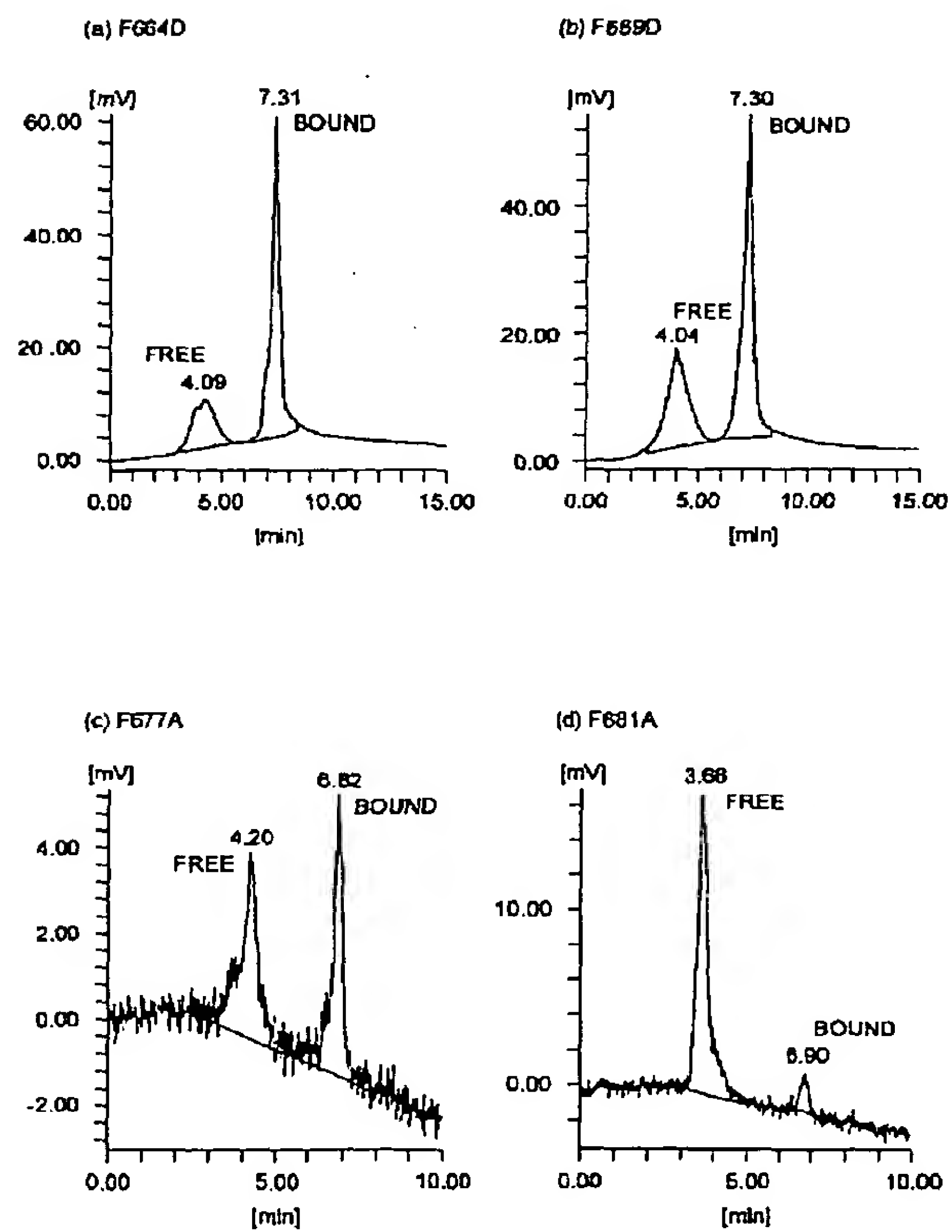
【図 1 9】



【図 2 0】



【図 2 2】



フロントページの続き

(72)発明者 辻 明彦  
 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
 バイオホトニクス研究所内